

Synthese und Charakterisierung von Inhibitoren der hämagglutininspaltenden Proteasen Furin und HAT



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Frank Sielaff

aus Würselen

Marburg/Lahn 2011

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am: 29. November 2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Torsten Steinmetzer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Garten

Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 2011

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Steinmetzer am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Januar 2008 bis Oktober 2011 durchgeführt.

„42“

**Douglas Adams,
Per Anhalter durch die Galaxis**

Abkürzungen

Abkürzungen für Aminosäuren und deren Derivate entsprechen den Empfehlungen der *IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) und des *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB)¹ und werden im Drei- oder im Ein-Buchstaben-Code verwendet. Sofern nicht anders gekennzeichnet, besitzen alle Aminosäuren und ihre Derivate L-Konfiguration. Abkürzungen für chemische Verbindungen sind aus den einschlägigen Nachschlagewerken *Methods of organic chemistry* (Houben-Weyl), *March's Advanced organic chemistry* und *Greene's Protective groups in organic synthesis* übernommen.

Å	Ångström ($1\text{Å} = 10^{-10}\text{ m}$)
Abu	2-Aminobuttersäure
ACN	Acetonitril
AMBA	4-Amidinobenzylamid
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
ber.	berechnet
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	bovines Serumalbumin
Bzls	Benzylsulfonyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
Cha	Cyclohexylalanin
CMK	Chlormethylketon
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
Dec	Decanoyl
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

¹ <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcfn/>

Abkürzungen

EtOAc	Ethylacetat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FVIIa	Faktor VIIa
FXa	Faktor Xa
gef.	gefunden
ges.	gesättigte
HA	Hämagglutinin
HAc	Essigsäure
hArg	<i>homo</i> -Arginin
HAT	<i>human airway trypsin-like protease</i>
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
hPhe	<i>homo</i> -Phenylalanin
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HTS	<i>high-throughput screening</i> , Hochdurchsatzscreening
iNip	Isonipecotinsäure
kDa	Kilodalton
K _i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
M	molar
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i> (Zellen)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert.</i> -Butylether
N	normal
NAPAP	<i>N</i> _α -(2-Naphthylsulfonyl)glycyl-D/L-4-amidinophenylalaninipiperidid
Nas	Naphthylsulfonyl
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie

Nva	Norvalin
OD	Optische Dichte
OMe	Methylester
OtBu	O- <i>tert.</i> -Butylester
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PC	Proteinkonvertase
PDB	Protein data base
PFU	<i>plaque forming units</i>
pH	potentia Hydrogenii
Pip	Piperidin
pK _a	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
pNA	<i>para</i> -Nitroanilin
ppm	<i>parts per million</i>
PyBOP	Benzotriazol-1-yl- <i>N</i> -oxy-tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphat
Pyr	Pyridyl
R _f	Retentionsfaktor (DC)
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
TAPAP	Tosyl-D/L-3-Amidinophenylalanin-piperidid
tBu	<i>tert.</i> -Butylester
TFA	Trifluoressigsäure
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMPRSS2	<i>transmembrane protease serine 2</i> ; Synonym: Epitheliasin
TMS	Trimethylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTSP-II	<i>Type II transmembrane serine protease</i>
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit der uninhibierten Enzymreaktion

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	7
Inhaltsverzeichnis.....	10
1 Einleitung	13
1.1 Influenza	13
1.2 Vermehrungszyklus von Grippeviren.....	16
1.3 Behandlungsstrategien gegen Grippe	20
1.4 Nomenklatur nach Schechter und Berger	22
1.5 Ziel dieser Arbeit	23
2 Furin	25
2.1 Einführung	25
2.2 Kristallstruktur des Furins	31
2.3 Bekannte Furininhibitoren	34
3 Synthetisierte Inhibitoren des Furins.....	39
3.1 Amidinohydrazonderivate	39
3.2 Erster Syntheseyklus – Unsubstituierte Amidinohydrazone und acylierte Aminoguanidine.....	42
3.3 Zweiter Syntheseyklus – Modifizierungen an der Anilinfunktion der Leitstruktur MI-0007	46
3.4 Dritter Syntheseyklus – Dimerisierte Inhibitoren	48
3.5 Vierter Syntheseyklus – Benzyletherderivate	51
3.6 Inhibitoren anderer Strukturtypen	56
3.7 Stabilitätsuntersuchungen	58
3.8 Untersuchungen zum Bindungsmodus	61
3.9 Untersuchungen zur Selektivität.....	64
4 Human Airway Trypsin like Protease – HAT	67
4.1 Einführung	67
4.2 Homologiemodell der HAT	73
4.3 Substrate	75

4.4	Inhibitoren	77
4.5	HAT und TMPRSS2 aktivieren Influenza-A-Viren	78
5	Entwicklung und Synthese der HAT-Inhibitoren	81
5.1	Entwicklung eines Tests zur Bestimmung der HAT-Aktivität	81
5.2	Untersuchung verschiedener Inhibitortypen	84
5.3	Synthese der substratanalogen Inhibitoren.....	89
5.4	Inhibitoren des TAPAP-Typs.....	96
5.5	Hemmung der HAT durch substratanaloge Inhibitoren.....	100
5.6	Hemmung der HAT durch Inhibitoren des TAPAP-Typs	107
5.7	Untersuchungen zur Selektivität	111
5.8	Untersuchungen zur Hemmung der Virusausbreitung	114
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	121
6.1	Inhibitoren des Furins	121
6.2	Inhibitoren der HAT.....	123
7	Experimenteller Teil	127
7.1	Material und Methoden	127
7.2	Enzymkinetische Messungen unter Verwendung von AMC-Substraten.....	129
7.3	Enzymkinetische Messungen unter Verwendung von pNA-Substraten	131
7.4	Allgemeine Synthesevorschriften	133
7.5	Synthese der Vorstufen	137
7.6	Synthese der Inhibitoren	162
	Referenzen	191
	Veröffentlichungen	205
	Verzeichnis der MI-Verbindungen	206
	Danksagung	209
	Erklärung	211
	Curriculum Vitae	213

1 Einleitung

1.1 Influenza

Eine Infektion mit Influenzaviren vom Typ A und B äußert sich gewöhnlich durch ein abrupt einsetzendes, schweres Krankheitsgefühl mit hohem Fieber, das bei jungen, gesunden Erwachsenen bis zu zwei Wochen anhält. Wesentlich drastischere Verläufe sind bei alten Menschen oder Patienten mit Vorerkrankungen nicht ungewöhnlich (Zambon, 2001). In jedem Herbst und Winter führen saisonale Ausbrüche allein in Deutschland zu mehr als 1.000 Toten, in der Grippesaison 1995/1996 wurden sogar über 31.000 Todesfälle verzeichnet (Steinmetzer, 2011). Auch Säugetiere und vor allem Vögel, erkranken an Influenza und bilden ein Reservoir für genetische Reassortierungen verschiedener Influenzastämme.

Wesentlich bedrohlicher als die alljährlichen Ausbrüche sind die in regelmäßigen Abständen auftretenden Influenzapandemien, die ausschließlich von Influenza-A-Viren hervorgerufen werden (Klenk, 2011). Die letzte Pandemie in der Saison 2009/2010 führte allein in Deutschland zu 250 Todesfällen und 7882 Krankenhauseinweisungen (Buda, 2010). Allerdings ist von einer wesentlich höheren Dunkelziffer auszugehen, da nicht alle Todesfälle immer eindeutig mit einer Infektion durch ein Influenzavirus in Verbindung gebracht werden. Weltweit führte diese Pandemie zu mindestens 16.813 Toten (Taubenberger and Morens, 2010), wobei junge, gesunde Erwachsene am häufigsten betroffen waren. Die Ursache hierfür ist unklar (Buda, 2010). Eine kumulative Darstellung der weltweit registrierten Todesfälle, die eindeutig mit der Grippepandemie im Zeitraum von April 2009 bis März 2010 in Verbindung gebracht werden können, ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

Die Pandemie mit der bisher größten Zahl von Todesopfern war die sogenannte Spanische Grippe von 1918/1919. Sie forderte weltweit 50 bis 100 Millionen Todesopfer. Alle pandemischen Influenza-A-Viren, die derzeit auftreten, können auf dieses H1N1-Virus zurückgeführt werden und sind Reassortanten aus Genen dieses Virus und anderen Influenzaviren (Morens et al., 2009). Seit 1919 wurden vier weitere Pandemien gezählt, die jedoch nicht derart drastisch verliefen. Dazu zählen die Asiatische Grippe von

1957 (H2N2), die Hongkong-Grippe von 1968 (H3N2), die russische Grippe von 1977 (H1N1) und die bereits genannte Pandemie von 2009 (Taubenberger and Morens, 2010; Klenk et al., 2011).

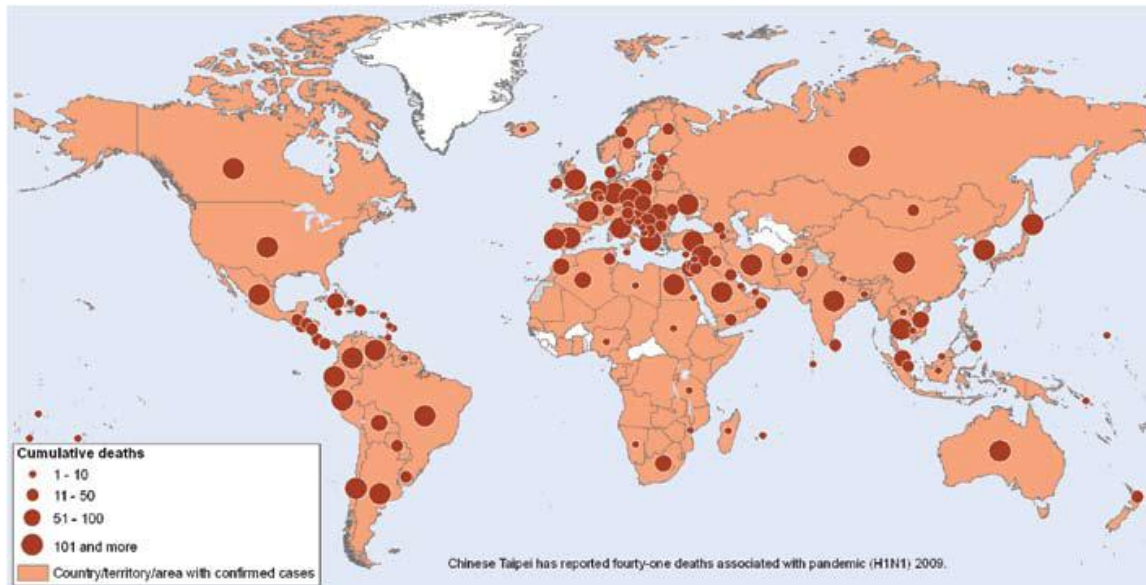


Abbildung 1.1 Zahl der weltweiten Todesfälle im Zeitraum von April 2009 bis März 2010, die eindeutig dem pandemischen Influenzavirus (H1N1) zugeordnet werden können. Kumulative Darstellung von März 2010. Abbildung übernommen aus: Evolution of a pandemic A(H1N1) 2009, April 2009 – March 2010; WHO Switzerland.

Die Influenza-Oberflächenproteine Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N) werden genetisch in Subgruppen unterteilt; zurzeit sind 16 Subtypen des Hämagglutinins (H1 bis H16) und neun Subtypen der Neuraminidase bekannt (N1 bis N9). Zur eindeutigen Bezeichnung eines Virus werden die Subtypen hintereinander aufgeführt, wie z. B. Influenza A (H1N1) für das pandemische Virus von 1918 (Taubenberger and Morens, 2010).

Neben Influenza A sind zwei weitere Gattungen dieses Virus bekannt. Influenza B tritt hauptsächlich bei Menschen, in seltenen Fällen auch bei Robben auf und ist nicht so ansteckend wie die Viren vom Typ A (Osterhaus et al., 2000). Das natürliche Reservoir des Influenza-C-Virus ist ebenfalls der Mensch, obwohl einzelne Virusstämme auch aus Schweinen isoliert wurden. Die Erkrankung, die eine Infektion mit Influenza-C-Viren hervorruft, ähnelt mehr einem gewöhnlichen grippalen Infekt und verläuft bei weitem nicht so drastisch (Zambon, 1999). Im Folgenden sollen die Influenzaviren vom Typ B und C nicht weiter betrachtet werden.

Auch Tiere sind von Influenzainfektionen betroffen. Wildvögel überleben eine Influenzainfektion in der Regel asymptomatisch, während domestiziertes Geflügel eine hohe Sterblichkeit zeigt (Michaelis et al., 2009). Die hochpathogene Vogelgrippe trat 1997 auf Geflügelmärkten in Hongkong auf und führte dazu, dass komplette Bestände in Geflügelfarmen gekeult werden mussten. Diese Viren gehören alle zum H5- oder H7-Subtyp und können vereinzelt auch Menschen infizieren (sog. Zoonose). Im Gegensatz zur saisonalen Grippe sind diese Infektionen nicht nur auf den Respirationstrakt beschränkt, sondern breiten sich in allen Organen aus, so dass mehr als 50 % der infizierten Patienten an Nierenversagen und Schädigungen des ZNS sterben. Glücklicherweise wurden bisher keine Übertragungen von Mensch zu Mensch beobachtet (Michaelis et al., 2009). Die WHO gibt die Zahl der klinisch bestätigten menschlichen Todesopfer bis zum heutigen Zeitpunkt mit 330 an (WHO, 2011).

1.1.1 Antigendrift und Antigen shift

Die Begriffe Antigendrift und Antigen shift beschreiben die Ursachen für genetische Veränderungen in Influenzaviren. Diese genetischen Veränderungen führen in vielen Fällen zu attenuierten oder nicht lebensfähigen Viren. Durch Selektionsdruck erhalten jedoch einzelne mutierte Viren Wachstumsvorteile und vermehren sich deshalb stärker. Diese Viren können bei Menschen zu schwereren Krankheitsverläufen und zu einer höheren Mortalität führen, da das Immunsystem diese veränderten Viren unter Umständen nicht mehr erkennen kann (Zambon, 1999).

Unter Antigendrift versteht man die kontinuierliche Spontanmutation, die bei jedem Replikationsvorgang des Virus auftreten kann. Dabei werden auch die Oberflächenproteine des Virus teilweise verändert, so dass es sich bei hinreichend großen Veränderungen der Immunantwort entziehen kann. Die Antigendrift wird durch die viruseigene RNA-Polymerase begünstigt, die keine Korrekturlesefunktion aufweist und deshalb bei der Replikation des viralen Genoms eine hohe Zahl von Punktmutationen erzeugt. Die Anzahl der Punktmutationen liegt in einer Größenordnung zwischen 1×10^{-3} und 8×10^{-3} pro Jahr und Aminosäure (Zambon, 1999; Taubenberger and Morens, 2010).

Antigen shifts können auftreten, wenn zwei verschiedene Viren denselben Wirt infizieren und durch Reassortierung ein neues Virus entsteht, das Eigenschaften beider originärer Viren besitzt. Diese Antigen shifts sind wesentlich seltener als die Antigendrift.

Die Pathogenität eines solchen Virus ist nicht vorhersagbar, da alle Oberflächenantigene verändert sein können und so vom Immunsystem möglicherweise nicht mehr erkannt werden. Ein solches Szenario ist 1997 in Hongkong prinzipiell möglich gewesen, als aviäre H5N1-Viren auch Menschen infiziert haben. Ein paralleler Ausbruch der saisonalen Influenza hätte die Bedingungen für einen solchen Shift geschaffen. Da jedoch keine Mensch-zu-Mensch-Übertragungen stattgefunden haben, hat sich die aviäre Influenza bisher nicht durch einen Antigen-shift an den Menschen angepasst. Falls dies jedoch zukünftig passieren sollte, wäre mit einer sehr hohen Zahl von Todesopfern zu rechnen (Zambon, 1999; Klenk et al., 2011).

1.2 Vermehrungszyklus von Grippeviren

Zu Beginn eines Vermehrungszyklus (Abbildung 1.2) bindet ein Influenzavirus im Respirationstrakt auf der Oberfläche einer Wirtszelle an Glykoproteine mit endständigem Sialinsäurerest. Die Bindung wird über das virale Hämagglutinin vermittelt (Gamblin and Skehel, 2010) und ist eher schwach ($K_d > 0,1 \text{ mM}$), was durch multiple Bindungen kompensiert wird (Matrosovich et al., 2009). Durch Endocytose gelangen die Viren in Endosomen ins Innere der Zelle, wo sich, bedingt durch den niedrigen pH-Wert (pH 5-6), die Konformation des Hämagglutinins verändert (Zambon, 1999). Die cytoplasmatische Domäne der HA2-Untereinheit dissoziiert von den M1-Matrixproteinen ab und die HA1-Untereinheit faltet sich zurück. Der freigelegte, hydrophobe N-terminale Bereich der HA2-Untereinheit wird als Fusionspeptid bezeichnet (Garten and Klenk, 2008). Voraussetzung für diesen Konformationswechsel ist jedoch, dass das Vorläuferprotein des aktiven Hämagglutinins (HA0) im vorangegangenen Vermehrungszyklus von Proteasen des Wirtes in zwei Untereinheiten (HA1 und HA2) gespalten wird, die weiterhin durch eine Disulfidbrücke verbunden sind (Garten and Klenk, 1999). Das Fusionspeptid nimmt eine haarnadelartige Konformation ein und verbindet Lipide aus der Virus- und der Endosomenmembran, so dass unter Beteiligung mehrerer HA-Trimere eine Fusionspore entsteht (Garten and Klenk, 2008). Allerdings ist zurzeit der genaue Mechanismus dieses Vorganges noch nicht geklärt (Gamblin and Skehel, 2010). In den Endosomen gelangen außerdem durch M2-Kanäle Protonen in das Innere des Virus. Die steigende Protonenkonzentration lässt die viralen Ribonucleoprotein-Komplexe von dem M1-Matrixprotein abdiffundieren und setzt diese frei (Gong et al., 2009).

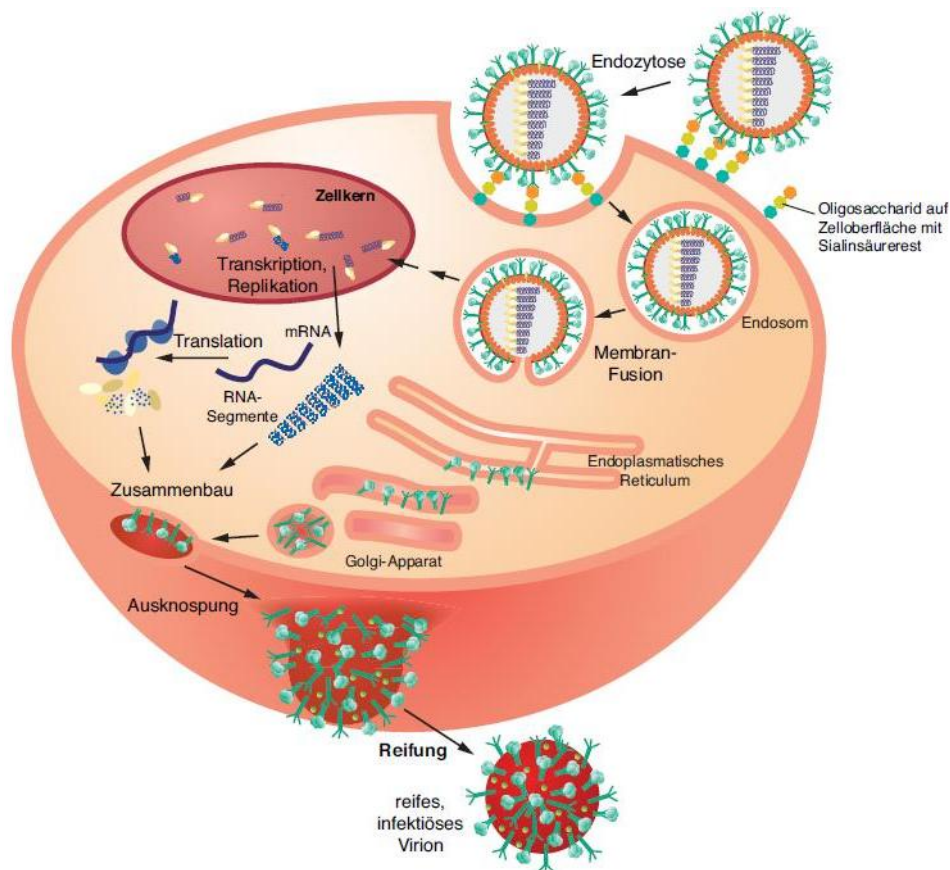


Abbildung 1.2 Vermehrungszyklus von Influenzaviren. Der Zyklus beginnt mit dem Andocken des viralen Hämagglutinins an mehrere sialinsäurehaltige Glykoproteine auf der Zelloberfläche. Nach der Endocytose bildet sich im sauren pH-Wert des Endosoms eine Fusionspore. Vermittelt wird dies durch die HA2-Untereinheit des Hämagglutinins. Das virale RNP wird freigesetzt und im Zellkern prozessiert. Die translatierten Virusproteine und die neuen RNA Kopien werden zur Zellmembran transportiert. Die Oberflächenproteine des Virus wandern durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat ebenfalls an die Zelloberfläche. Durch Ausknospung schnürt sich ein neues Viruspartikel von der Wirtszelle ab. Abbildung übernommen aus (Steinmetzer, 2011).

Nach der Bildung der Fusionspore durch das Hämagglutinin werden die acht freien Minusstrang-RNA-Segmente in das Cytosol abgegeben und über Importine in den Zellkern transportiert (Gabriel et al., 2011). Dort findet die Transkription der RNA in eine mRNA statt. Diese wird in das Cytosol translokalisiert und es kommt zur Synthese der neuen viralen Proteine. Außerdem wird im Zellkern aus der Minusstrang-RNA ein Plusstrang repliziert. Dieser Plusstrang dient als Matrize für die Synthese neuer Minusstrang-RNA für die nächste Generation der Influenzaviren. Beide Prozesse, die Transkription und die Replikation, werden durch die viruseigene RNA-Polymerase katalysiert (Matrosovich et al., 2009).

Die translatierten Virusproteine und die neue virale Minusstrang-RNA wandern an die Zelloberfläche, wo durch Knospung ein neues Viruspartikel abgeschnürt wird. Dieses

Viruspartikel ist noch durch sein Hämagglutinin an Sialinsäure auf der Wirtszelle gebunden. Die Sialinsäure wird von den Wirtsglykoproteinen durch die virale Neuraminidase abgespalten, so dass die Sialinsäure zunächst an dem neuen, freigesetzten Virus verbleibt (Gamblin and Skehel, 2010). Aufgrund der niedrigen Affinität der Sialinsäure zu dem Hämagglutinin diffundiert sie später ab und es verbleibt ein neues, infektiöses Virus.

1.2.1 Hämagglutininenspaltung

Wie zuvor beschrieben, ist die Spaltung des Hämagglutininvorläuferproteins (HA0) essentiell für die Infektiosität des Virus. Da Influenzaviren für diesen Zweck keine eigene Protease besitzen, sind sie dafür auf Proteasen des Wirtes angewiesen (Skehel and Wiley, 2000). Die Spaltsequenz ist ein wichtiger Faktor für die Pathogenität der Viren, so dass zwischen hochpathogenen und wenig pathogenen Viren unterschieden wird (Garten and Klenk, 2008). In Tabelle 1.1 sind einige charakteristische Spaltsequenzen zusammengestellt.

Tabelle 1.1 Darstellung charakteristischer Spaltsequenzen des HA0 verschiedener Hämagglutininsubtypen, die durch verschiedene Proteasen gespalten werden. Die N-terminalen Aminosäuren des durch die Spaltung gebildeten HA2 sind hochkonserviert und ermöglichen die Fusion mit der Endosomenmembran. Darstellung modifiziert nach (Steinmetzer, 2011).

Trypsinartige Serinproteasen (z. B. HAT, TMPRSS2)		Proteinkonvertasen (z. B. Furin)	
H1:	...IQS R ↓GLFG...	H5:	... RKKR ↓GLFG...
H2:	...IES R ↓GLFG...	H7:	... RKKR ↓GLFG...
H3:	...KQ T R↓GIFG...		

Das HA0 von gering pathogenen Viren besitzt an der Spaltstelle ein einzelnes Arginin (oder in Einzelfällen ein Lysin) und kann im menschlichen Körper deshalb nur in den Geweben gespalten werden, in denen die entsprechenden Proteasen exprimiert werden. So konnte in den 1970er Jahren *in-vitro* gezeigt werden, dass Trypsin HA0 spaltet. Da eine Influenzainfektion im Respirationstrakt verläuft, kann aber gerade Trypsin *in-vivo* nicht für die Spaltung verantwortlich sein (Klenk et al., 1975). Inzwischen konnten jedoch mehrere trypsinartige Serinproteasen aus dem Respirationstrakt identifiziert wer-

den, die eine solche Spaltung katalysieren. Dazu zählen die *human airway trypsin-like protease* (HAT), die *transmembrane protease serine 2* (TMPRSS2) und die *transmembrane protease serine 4* (TMPRSS4) (Böttcher et al., 2006; Chaipan et al., 2009; Böttcher-Friebertshäuser et al., 2010). Da die spaltenden Proteasen nur in bestimmten Organen exprimiert werden, ist die Infektion mit den wenig pathogenen Viren im Menschen vor allem auf den Respirationstrakt beschränkt. In Vögeln werden diese HA0-Subtypen im Intestinaltrakt gespalten und verlaufen meist asymptomatisch (Garten and Klenk, 2008).

Das HA0 von hochpathogenen Viren hingegen hat eine multibasische Spaltstelle mit der Sequenz –Arg-Xxx-Lys/Arg-Arg↓-Xxx– (wobei Xxx beliebige Aminosäuren kennzeichnet), hinter der es von der Proproteinkonvertase Furin, der PC6 oder auch der TMPRSS13 gespalten werden kann (Stieneke-Gröber et al., 1992; Okumura et al., 2010). Furin kommt im menschlichen Körper und in Vögeln ubiquitär vor, weshalb das HA0 in allen Geweben aktiviert werden kann. Dies ist eine Voraussetzung für schwere systemische Influenzainfektionen, die mit einer hohen Mortalität einhergehen (Hatta and Kawaoka, 2002).

1.2.2 Rezeptoraffinität des Hämagglutinins

Obwohl alle aviären hochpathogenen Viren eine polybasische Spaltstelle im HA0 besitzen und eine hohe Mortalität in Menschen verursachen, waren bisher verhältnismäßig wenig Menschen von einer Ansteckung mit diesen Viren betroffen. Dies wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass die Bindung des Hämagglutinins an seine sialinsäurehaltigen Rezeptoren spezifisch für die jeweilige Spezies ist (Gamblin and Skehel, 2010). Viren, die aus Vögeln und Pferden stammen, binden bevorzugt an Sialinsäuren, die über eine α -2,3-glykosidische Bindung mit Galaktose verknüpft sind; humanpathogene Viren hingegen bevorzugen Sialinsäuren, die α -2,6-glykosidisch verknüpft sind. Die geringe Gefahr für Menschen, sich mit aviären Viren zu infizieren, erklärt sich dadurch, dass im humanen Respirationstrakt fast ausschließlich α -2,6-glykosidische Bindungen zu finden sind (Matrosovich et al., 2009).

In Tracheazellen von Schweinen werden beide Arten von gebundenen Sialinsäuren gefunden, so dass sich hier beide Arten von Viren vermehren können (Matrosovich et al., 2009). Durch eine Koinfektion beider Virustypen in Schweinen ist es denkbar, dass eine

Reassortierung stattfindet und ein pandemisches, humanpathogenes Virus entsteht (Ludwig et al., 1995).

Unter den Virusgruppen, die 2009 für die Influenzapandemie verantwortlich waren, fanden sich auch einzelne Viren, auf deren HA-Gen eine Asparaginsäure an Position 222 gegen ein Glycin ausgetauscht war. Diese Substitution ermöglicht eine Bindung an beide Arten von glykosidisch gebundenen Sialinsäuren und wird mit einem stärkeren Krankheitsverlauf beim Menschen in Verbindung gebracht. Auch im Genom des Virus, das die Spanische Grippe 1918 verursacht hat, wurde diese Substitution identifiziert (Buda, 2010; Klenk et al., 2011).

1.3 Behandlungsstrategien gegen Grippe

Die bisher wirksamste Maßnahme zur Verhinderung einer Grippeinfektion ist die Impfung. Da sich aber nicht die gesamte Bevölkerung impfen lässt, ist ein vollständiger Impfschutz nicht gegeben. Außerdem muss der Impfstoff jedes Jahr an die auftretenden Virusstämme angepasst werden, wodurch eine erneute Impfung erforderlich wird. Die WHO gibt im Frühjahr die für den jeweiligen Herbst geltenden Empfehlungen für die Impfstoffzusammensetzung bekannt (Pfleiderer, 2011). Da die konkrete Situation im Herbst nicht voraussagbar ist, bleibt jedoch auch nach einer erfolgten Impfung ein gewisses Maß an Unsicherheit bestehen. Erschwerend kommt hinzu, dass von der Identifizierung eines pandemischen Virus bis zur Verfügbarkeit eines Impfstoffes ungefähr ein halbes Jahr vergeht. Auch wenn gesetzliche Erleichterungen eine schnellere Verfügbarkeit sicherstellen sollen, zeigte sich bei der letzten Pandemie dennoch eine weitverbreitete Skepsis gegenüber dem neuen Impfstoff (Pandemrix[®]), so dass nur eine Impfquote von ca. 10 % der Bevölkerung erreicht werden konnte (Zündorf and Dinger, 2011).

Deshalb müssen effektive Therapiemöglichkeiten für die akute Influenzabehandlung entwickelt werden. Entsprechend dem in Kapitel 1.2 dargestellten Vermehrungszyklus bieten sich eine Reihe von Interventionsmöglichkeiten an, die Gegenstand zahlreicher Untersuchungen sind. Für einen Überblick sei auf den Übersichtsartikel von Gong verwiesen (Gong et al., 2009).

In Deutschland sind zurzeit nur drei Arzneistoffe gegen die Virusgrippe klinisch verwendbar. Amantadin gehört zur Gruppe der M2-Kanalblocker und verhindert den Influx von Protonen in das Viruslumen und damit die Freisetzung der viralen RNA. Amantadin ist jedoch ausschließlich gegen Influenzaviren vom Typ A wirksam und muss, um optimale Wirkung entfalten zu können, bei ersten Anzeichen einer Erkrankung, besser noch prophylaktisch, verabreicht werden. Dem stehen allerdings erhebliche Nebenwirkungen, wie z. B. Wahrnehmungsstörungen und Stimmungsschwankungen, Übelkeit und Erbrechen sowie Störungen der Blutdruckregulation entgegen. Außerdem ist eine hohe, schnell zunehmende Resistenzrate zu beobachten (Gong et al., 2009; Klebe and Schlitzer, 2011). Der strukturell verwandte Arzneistoff Rimantadin ist in den USA zugelassen, weist jedoch ebenfalls eine hohe Resistenzrate auf.

Die Hemmstoffe der viralen Neuraminidase (Abbildung 1.3), Oseltamivir (Tamiflu®) und Zanamivir (Relenza®), sind somit die einzige Behandlungsoption für schwer erkrankte Patienten.

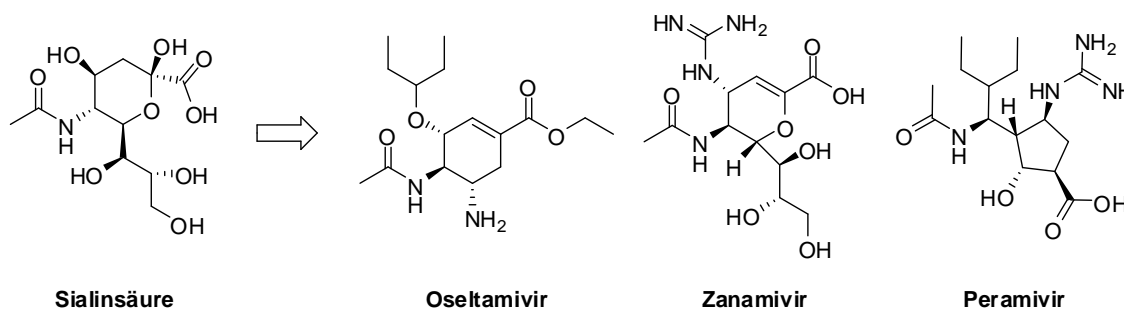


Abbildung 1.3 Strukturen der von Sialinsäure abgeleiteten Neuraminidasehemmstoffe Oseltamivir, Zanamivir und Peramivir. Sie stellen sogenannte Übergangszustands-Analoga der viralen Neuraminidase dar (Reece, 2007; Klebe and Schlitzer, 2011).

Neben dem kurativen Effekt für die infizierten Patienten verringern die Neuraminidasehemmstoffe die weitere Ausbreitung der Viren. In der Saison 2008/2009 waren allerdings über 90 % der Viren resistent gegen Oseltamivir, wobei der Anteil der resistenten Viren von Saison zu Saison schwankt. So wies das pandemische Virus von 2009/2010 eine geringere Resistenzrate gegenüber Oseltamivir auf (Boltz et al., 2010). Die resistenten Viren sind im Allgemeinen noch sensitiv gegenüber Zanamivir (Herold, 2011), das jedoch oral nur eine sehr geringe Bioverfügbarkeit besitzt und deshalb per Inhalation appliziert werden muss. Bei schwer erkrankten Patienten mit Pneumonie kann dieser Weg der Applikation allerdings problematisch sein, so dass in solchen Fällen eine parenterale Gabe von Zanamivir erwogen werden kann, die aber einen *off-label use* dar-

stellt (Herold, 2011). Für die Wirksamkeit einer Therapie mit Neuraminidase-hemmstoffen ist es wichtig, die Therapie spätestens 48 Stunden nach Auftreten erster Symptome zu beginnen. Der Neuraminidasehemmstoff Peramivir befindet sich in der klinischen Prüfung, ist in Japan jedoch schon zugelassen (Klebe and Schlitzer, 2011).

Die Synthese von Oseltamivir ist 9-stufig und stellt im kommerziellen Maßstab eine große Herausforderung dar, was unter anderem durch ein explosives Azid-Intermediat und drei Stereozentren im Molekül begründet ist. Während der Pandemie 2009/2010 konnte die Firma Roche als einziger Hersteller deshalb die außergewöhnlich große Nachfrage nach Oseltamivir nur mit Schwierigkeiten befriedigen (Holzgrave, 2011).

1.4 Nomenklatur nach Schechter und Berger

In der vorliegenden Arbeit werden in der Folge Substrate und substratanaloge Inhibitoren für Proteasen diskutiert. Zur Beschreibung dieser Verbindungen und ihrem Bindungsmodus wird die Nomenklatur nach Schechter und Berger verwendet, die 1967 am Beispiel des Papains eingeführt wurde (Abbildung 1.4).

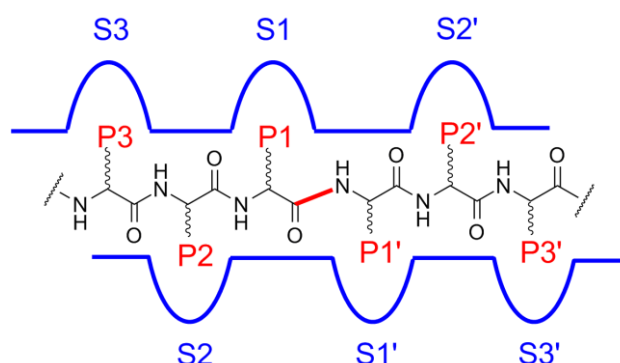


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Nomenklatur nach Schechter und Berger. Das Enzym mit seinen Bindetaschen ist in blau, das Substrat als Peptidkette mit den Seitenketten in rot dargestellt. An der rot gezeichneten Peptidbindung erfolgt die proteolytische Spaltung.

Sie ermöglicht eine Benennung der Aminosäurereste von Substraten und substratanaloge Inhibitoren und den entsprechenden Bindetaschen im aktiven Zentrum der Enzyme. Die Aminosäuren des Substrates werden mit P (für Peptid) bezeichnet und werden von der Spaltstelle des Enzyms in Richtung des N-Terminus aufsteigend nummeriert. Die Reste, die C-terminal zur Spaltstelle liegen, werden mit P' bezeichnet und aufsteigend in Richtung des C-Terminus des gespaltenen Peptids nummeriert. Entsprechend werden die Bindetaschen des Enzyms mit S (für Subsite) und S' bezeichnet und nummeriert (Schechter and Berger, 1967).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Gegenstand der Forschung war bisher hauptsächlich die Entwicklung von Arzneistoffen gegen viruseigene Targets. Dies hat, wie bereits erwähnt, einen Selektionsdruck auf die Viren zur Folge. Außerdem mutiert das Influenzavirus auch im Rahmen seines natürlichen Vermehrungszyklus, so dass die Viren schnell gegen Arzneistoffe, die sich gegen viruseigene Targets richten, resistent werden können.

Inzwischen wurden mit der Propeptidkonvertase Furin und der trypsinartigen Serinprotease HAT Proteasen identifiziert, die das HA0 verschiedener Virussubtypen spalten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten für beide Proteasen Inhibitoren entwickelt, synthetisiert und charakterisiert werden. Der Vorteil dieser Strategie ist, dass die humanen Proteasen nicht mutieren und damit keine Resistenzbildung gegen derartige Arzneistoffe zu erwarten ist. Deshalb könnten solche Inhibitoren potentielle Wirkstoffe zur Behandlung von Influenzainfektionen darstellen.

In den Kapiteln 2 und 3 der Arbeit wird die Entwicklung von Furininhibitoren beschrieben. Die Ziele im Einzelnen waren:

- Die Synthese nicht-peptidischer Inhibitoren und die Bestimmung ihrer Hemmkonstanten basierend auf einer mittels *screening* identifizierten Leitstruktur mit zwei Amidinohydrazongruppen. Im Gegensatz zu bereits bekannten multibasischen peptidischen Inhibitoren sollten solche Verbindungen aufgrund ihrer verminderten Basizität besser als Arzneistoffkandidaten geeignet sein.
- Die Selektivität der synthetisierten Furininhibitoren gegenüber trypsinartigen Serinproteasen zu untersuchen.
- Einen möglichen Bindungsmodus dieser Amidinohydrazonderivate, basierend auf der bekannten Kristallstruktur des Furins im Komplex mit dem irreversiblen Inhibitor Dec-RVKR-CMK, mittels Docking zu bestimmen.
- In Stabilitätsuntersuchungen die Zersetzungsprodukte der Inhibitoren zu identifizieren.

Die Funktion der HAT und ihre Beteiligung bei einer Influenzainfektion wird in Kapitel 4, die Entwicklung ihrer Hemmstoffe wird in Kapitel 5 beschrieben. Die Ziele waren im Einzelnen:

- Die Etablierung eines enzymkinetischen Tests für HAT, um die Hemmkonstanten der Inhibitoren bestimmen zu können. Dazu sollten verschiedene Messbedingungen und Substrate untersucht werden.
- Die Erstellung eines Homologiemodells der HAT. Dieses sollte durch Überlagerung mit bekannten Kristallstrukturen verwandter trypsinartiger Serinproteasen im Komplex mit substratanalogen Inhibitoren verifiziert werden.
- Ein *screening* verfügbarer Verbindungen bezüglich ihrer Hemmwirkung auf HAT, da zu Beginn der Arbeit noch keine wirksamen Inhibitoren der HAT beschrieben waren.
- Die Synthese substratanaloger Inhibitoren mit decarboxylierten Argininmimetika als P1-Rest, basierend auf den Ergebnissen des initialen *screenings* und auf bisherigen Erfahrungen bei der Entwicklung substratanaloger Hemmstoffe anderer trypsinartiger Serinproteasen, wie Thrombin (Wiley et al., 1995; Gustafsson et al., 1996), Faktor Xa (Schweinitz et al., 2006; Stürzebecher et al., 2007), Urokinase (Künzel et al., 2002; Schweinitz et al., 2004) oder Faktor VIIa (Kadono et al., 2005; Shiraishi et al., 2008).
- Der Nachweis, dass ausgewählte Hemmstoffe in Zellkultur die Ausbreitung von Influenzaviren hemmen können. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt (AG Garten).
- Die Synthese basisch substituierter Phenylalaninderivate des 3-TAPAP-Typs und die Prüfung ihrer Eignung als Leitstruktur für die Entwicklung von HAT-Inhibitoren, da analoge Verbindungen bereits als Inhibitoren verschiedener trypsinartiger Serinproteasen bekannt sind (Stürzebecher et al., 1995; Stürzebecher et al., 1997; Stürzebecher et al., 1999; Steinmetzer et al., 2006).

2 Furin

2.1 Einführung

Furin ist eine Typ-I-Transmembranprotease, die zur Familie der Proproteinkonvertasen (Abschnitt 2.1.1) gehört. Die Proproteinkonvertasen sind Ca^{2+} -abhängige, subtilisinartige Serin-Endoproteasen und besitzen eine katalytische Triade aus Asp153, His194 und Ser368 (Henrich et al., 2003). Furin spaltet bevorzugt hinter Arginin an einer multibasischen Erkennungssequenz mit dem Konsensusmotiv -Arg-Xxx-Arg/Lys-Arg↓-Xxx-, wobei Xxx für eine beliebige Aminosäure steht (Rockwell et al., 2002). Die translatierte Form des Furins besteht aus 794 Aminosäuren und wird in zwei Schritten autokatalytisch aktiviert (Abschnitt 2.1.2). Die aktivierte Form des Furins wandert vom Trans-Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche und wieder zurück (Abschnitt 2.1.3). Die unterschiedliche Lokalisation des Furins ist eine Ursache, dass es zahlreiche physiologische Substrate spalten kann. Furin ist jedoch auch an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen beteiligt (Abschnitt 2.1.4). Eine Kristallstruktur des Furins im Komplex mit einem irreversiblen Chlormethylketoninhibitor konnte im Jahr 2003 gelöst werden; sie ist in Abschnitt 2.2 beschrieben. Einen Überblick über bisher entwickelte Furininhibitoren gibt Abschnitt 2.3.

2.1.1 Familie der Proproteinkonvertasen

Das Genom der Säugetiere codiert für ca. 30.000 Gene. 1,7 % dieser Gene codieren proteolytische Enzyme, die in sechs Clans eingeteilt werden: Serin-, Metallo-, Cystein-, Aspartyl-, Threonin- und Glutamyproteasen (Seidah et al., 2008; Rawlings et al., 2010). Die Unterteilung ergibt sich aus den Aminosäuren, die an der katalytischen Reaktion der jeweiligen Protease beteiligt sind, so dass sich für jeden Clan ein anderer Katalysemechanismus ergibt. Mit Ausnahme von Glutamyproteasen werden Vertreter jedes Clans auch in Menschen exprimiert (Turk, 2006).

Die Proproteinkonvertasen gehören zur Familie der subtilisinartigen Serinproteasen (Rawlings et al., 2010), die sich in zwei Unterfamilien aufteilt. Die größere Unterfamilie leitet sich vom Subtilisin Carlsberg ab, während der Prototyp der kleineren Subfamilie, zu der auch Furin gehört, das Kexin aus *Saccharomyces cerevisiae* ist. Alle sieben

bekannten furinartigen PC's sind streng Ca^{2+} -abhängig und in einem breiten pH-Spektrum aktiv (pH 5-8) (Molloy et al., 1999). Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht der sieben klassischen furinartigen PC's (Thomas, 2002).

Tabelle 2.1 Familie der furinartigen Propeptidkonvertasen. Angegeben sind die als Konsens beschlossenen Namen und vorhergegangene alternative Bezeichnungen, ihre primäre Lokalisation in den Zellen und die Phänotypen von Knockout-Mäusen (Thomas, 2002).

Enzym	alternative Bezeichnung	Lokalisation	Knockout-Phänotyp
Furin	PACE, PC1, SPC1	TGN / Endosomen	embryonale Letalität
PC2	SPC2	Sekretorische Granula	Hypoglykämie, Proinsulinämie, Glucagonmangel
PC1/3	PC1, PC3, SPC3	Sekretorische Granula	schwere Adipositas, Hyperproinsulinämie
PACE4	PACE4, SPC4	TGN / Endosomen	embryonale Letalität, Schädigungen des ZNS
PC4	SPC5	unbekannt	Sterilität (bei Frauen nur schwach ausgeprägt)
PC5/6A	PC5, PC6, SPC6	Sekretorische Granula	unbekannt
PC5/6B	PC5, PC6, SPC6	TGN / Endosomen	unbekannt
PC7	PC8, LPC, SPC7	TGN / Endosomen	lebensfähig, Schädigung des Thymus

Viele Proteine werden als inaktive Vorstufen gebildet. Diese Vorstufen von Hormonen, Neuropeptiden und anderen biologisch aktiven Peptiden werden im sekretorischen Signalweg von PC's aktiviert und in ihre biologisch aktive Form überführt (Fugere and Day, 2005). Auch Vorläuferproteine der extrazellulären Matrix, von Rezeptoren oder Plasmaproteinen gehören zu ihren Substraten. Daneben sind die PC's an der Prozessierung von Proteinen humanpathogener Organismen beteiligt und stellen deshalb interessante Targets für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen verschiedene Krankheiten dar. Physiologische und pathophysiologische Funktionen des Furins sind in Abschnitt 2.1.4 beschrieben.

Die meisten potentiellen Substrate wurden durch *in-vitro*-Experimente identifiziert. Da Furin-Knockout-Mäuse nicht lebensfähig sind, konnten Furinsubstrate auf diesem Wege

nicht *in-vivo* nachgewiesen werden. Allerdings konnte ein Mausmodell etabliert werden, das einen durch Interferon induzierbaren Furin-Knockout in der Leber aufweist. Die Mäuse mit diesem induzierten Mangel waren lebensfähig und zeigten keine physiologischen Schäden; ebenso wurde kein vollständiges Fehlen von aktivierten Furin-substraten in der Leber beobachtet. Für den Insulinrezeptor wurde beispielsweise eine vollständige Redundanz gefunden, während für verschiedene andere Substrate unterschiedliche Redundanzausmaße nachgewiesen wurden. Deshalb wird vermutet, dass andere Proproteinkonvertasen die Funktion des Furins übernehmen können; die Ursache für die fehlende Redundanz in der Embryogenese ist allerdings noch unklar (Roebroek et al., 2004).

Der schematische Aufbau der furinartigen Proproteinkonvertasen ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

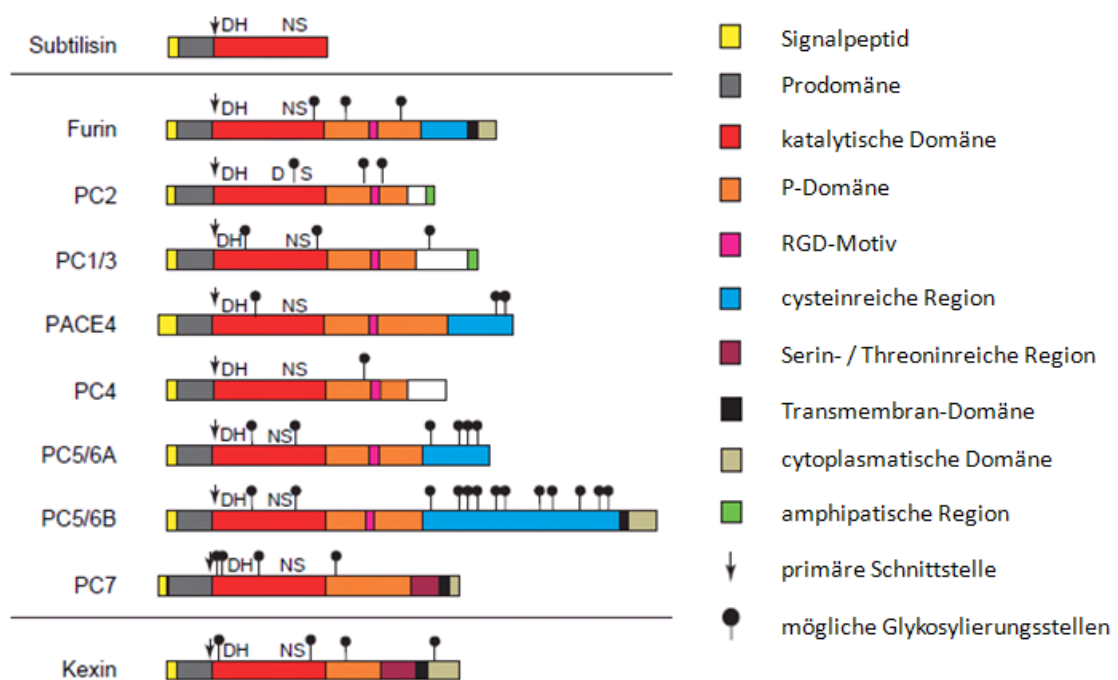


Abbildung 2.1 Schematischer Aufbau der humanen furinartigen PC's und des homologen Kexins aus Hefezellen im Vergleich zum bakteriellen Subtilisin. Von PC5/6 wurden zwei Isoformen identifiziert, die beide durch das gleiche Gen kodiert werden. Die Buchstaben über den schematischen Darstellungen geben die Aminosäuren der katalytischen Triade an (D für Asp, H für His und S für Ser). N kennzeichnet das Asn (D für Asp bei PC2) in der Oxyanionentasche. Darstellung modifiziert nach (Fugere and Day, 2005).

Aus dieser schematischen Abbildung werden die Ähnlichkeiten im Aufbau der PC's deutlich. Bezogen auf Furin weisen die Proproteinkonvertasen eine Sequenzhomologie von 54-70 % auf (Thomas, 2002). Dies kann ein Grund für die zuvor beschriebene Re-

dundanz sein. Neben dem Signalpeptid, das für die Translokalisierung des Proproteins in das endoplasmatische Retikulum verantwortlich ist, besitzen alle Proproteinkonvertasen Prodomänen mit mehreren basischen Aminosäuren an deren C-terminalen Bereich. An diesen Sequenzabschnitten erfolgt die primäre autokatalytische Aktivierung der PC's (vgl. Kapitel 2.1.2). Daneben besitzen alle sieben Enzyme eine sogenannte P-Domäne, die das katalytische Zentrum stabilisiert. Bei mehreren Mitgliedern der PC-Familie folgen weitere Domänen. Die cytoplasmatische Domäne steuert die Lokalisierung des Furins zwischen Trans-Golgi-Netzwerk und Endosomen (vgl. Kapitel 2.1.3).

2.1.2 Autokatalytische Aktivierung

Furin wird als 96 kDa schweres Proenzym mit einer N-terminalen Prodomäne exprimiert (Molloy et al., 1999). Die Prodomäne ist für die korrekte Faltung im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich (Steiner, 1998). Durch eine erste autokatalytische Spaltung nach dem Arg107 der Aminosäuresequenz -Arg-Thr-Lys-Arg₁₀₇- wird die Prodomäne mit einer Halbwertszeit von ca. zehn Minuten abgespalten (Abbildung 2.2). Diese bleibt jedoch mit dem Peptid nicht-kovalent verbunden ($IC_{50} = 14 \text{ nM}$) und hält das Furin weiterhin inaktiv (Steiner, 1998). Dieser Komplex wird in das Trans-Golgi-Netzwerk transportiert. Hier herrschen ein niedrigerer pH-Wert und eine erhöhte Ca^{2+} -Ionenkonzentration, die die zweite autokatalytische Spaltung begünstigen. Diese verläuft mit einer Halbwertszeit von zwei bis drei Stunden wesentlich langsamer (Molloy et al., 1999). Die Spaltung erfolgt nach dem Arg75 der Aminosäuresequenz -Arg-Gly-Val-Thr-Lys-Arg₇₅- innerhalb der Prodomäne. Die fehlende basische P4-Aminosäure, die für eine effiziente Spaltung durch Furin nötig ist, wird hier durch das Arginin in P6-Position ersetzt. Durch die zweite Spaltung diffundiert die Prodomäne ab und Furin liegt in seiner aktiven Form vor (Steiner, 1998).

Eventuell erfolgt eine dritte Spaltung in einer Upstream-Position zur Transmembrandomäne. Dieses sogenannte *shedding* ermöglicht den Transport des Furins in den extrazellulären Raum in dem es auch katalytisch aktiv ist. Diese dritte Spaltung ist vom Aktivierungszustand des Furins unabhängig (Molloy et al., 1999; Plaimauer et al., 2001).

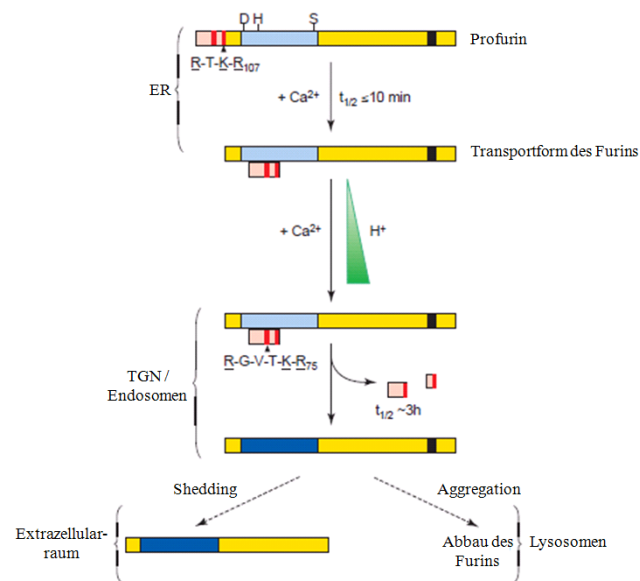


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Furinaktivierung. Die Prodomäne des Furins ist in Hellrot dargestellt, die Spaltsequenzen innerhalb der Prodomäne in Rot. Diese sind zusätzlich im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Die inaktive katalytische Domäne mit der katalytischen Triade (D, H, S) ist in Hellblau gezeichnet, die aktive katalytische Domäne in dunkelblau und die Transmembrandomäne in Schwarz. Nach der ersten autoprotolytischen Spaltung wandert die Transportform des Furins in das Trans-Golgi-Netzwerk. Hier wird bei niedrigem pH-Wert die Prodomäne ein zweites Mal gespalten und es entsteht aktives Furin. Durch sog. *shedding* kann die Transmembrandomäne abgespalten werden, wodurch Furin auch in den Extrazellulärraum gelangen kann. Darstellung modifiziert nach (Molloy et al., 1999).

2.1.3 Lokalisation des Furins

Nach erfolgter Aktivierung ist Furin im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert. Hier werden die Proteine des sekretorischen Signalweges nach Translation und Faltung im endoplasmatischen Retikulum an ihre entsprechenden Zielorte adressiert, wie z. B. Zelloberfläche, Endosomen oder Lysosomen (Schäfer et al., 1995). Furin bleibt aber nicht ausschließlich in einem Kompartiment lokalisiert, sondern wandert durch Endosomen an die Zelloberfläche und wieder zurück in das Trans-Golgi-Netzwerk. Verantwortlich dafür ist die 56 Aminosäuren umfassende cytoplasmatische Domäne des Furins. Hier befinden sich zwei Serinseitenketten, die durch die Casein-Kinase-II phosphoryliert werden können (Takahashi et al., 1995). Die Phosphorylierung und die Bindung eines PACS-1 (*Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1*) bestimmt die Lokalisation des Furins an der Zelloberfläche oder im Trans-Golgi-Netzwerk. Werden die Phosphorylierungen durch eine Isoform der PP2A (Protein Phosphatase 2) entfernt, verlässt das Furin seine aktuelle Position und wandert durch Endosomen in das Trans-Golgi-Netzwerk bzw. an die Zelloberfläche (Molloy et al., 1999).

2.1.4 Physiologische Prozesse und Pathophysiologie

Furin ist im Trans-Golgi-Netzwerk und an der Zelloberfläche aktiv und kann an beiden Orten seine physiologischen und pathophysiologischen Substrate aktivieren. Die unterschiedliche Lokalisierung ist der Grund für das breite Spektrum an Substraten, die durch Furin spaltbar sind. Beispielsweise werden die Pro-Formen der an der Blutgerinnung und der Plättchenaktivierung beteiligten Serumproteine Faktor IX, Protein C und des van-Willebrandt Faktors durch Furin aktiviert (Molloy et al., 1999). Weitere Furin-substrate mit physiologischer Funktion sind das Proinsulin, der Insulin-pro-Rezeptor, der Notch1-Rezeptor und der Vitamin B₁₂-pro-Rezeptor (Bravo et al., 1994; Kozyraki et al., 1998; Logeat et al., 1998). Zu den zahlreichen Vorläufern von Wachstumsfaktoren, die von Furin gespalten werden, gehören der *β-Nerve growth factor* (Seidah et al., 1996) und der *β-transforming growth factor* (β-TGF) (Dubois et al., 1995). In embryonalen Furin Knockout-Mäusen führt der Mangel an β-TGF zum Ausbleiben der axialen Rotation und zu Herzschädigungen und damit zum Tod 10,5 Tage *post-coitum* (Roebroek et al., 1998). Die genannten Substrate unterstreichen die Bedeutung des Furins für physiologische Prozesse. Vor Kurzem wurde eine Datenbank entwickelt, die einen umfassenden Überblick bekannter Furinsubstrate gibt (Tian et al., 2011).

Zu den pathogenen Substraten des Furins zählen die Oberflächen-Glykoproteine des HIV-1 und des Epstein-Barr-Virus. Das Oberflächenprotein gp160 des HIV-1 muss in die Untereinheiten gp41 und gp120 gespalten werden, um das Verschmelzen der Virusmembran mit der Zellmembran des Wirtes zu ermöglichen (Hallenberger et al., 1992). Der Vorläufer des Influenza Hämagglutinins (HA0) muss von Furin gespalten werden, um die Infektiosität der Influenzaviren zu ermöglichen. Hochpathogene aviäre Influenzaviren der Subtypen H5 und H7 besitzen in ihrem HA0 die charakteristische Furin-Spaltsequenz (Stieneke-Gröber et al., 1992) (vgl. Kapitel 1.2.1). Ebenso werden Oberflächen-Glykoproteine von Masern-, Ebola- und Marburgviren durch Furin oder eine furinartige PC gespalten (Shiryaev et al., 2007). Auch Toxine von Bakterien können durch Furin aktiviert werden, so z. B. das Diphtherie-, das Anthrax- und das Shiga-Toxin (Chiron et al., 1994; Garred et al., 1995; Zhang et al., 2001).

In einigen Tumorgeweben konnte eine erhöhte Expression von PC's nachgewiesen werden. Dies wird mit einer größeren Aggressivität und Invasivität der Tumore in Zusammenhang gebracht, da viele Vorstufen von Wachstumsfaktoren und Matrixmetallo-

proteasen Substrate des Furins oder anderer PC's sind (Bassi et al., 2001; Bassi et al., 2005; Scamuffa et al., 2008; D'Anjou et al., 2011). Allerdings sind auch Pro-Formen von Adhäsionsproteinen bekannt, die das Ausmaß der Metastasierung von Tumoren verringern, wenn sie durch Furin aktiviert werden (Müller et al., 2004).

Die Pro-Form der β -Sekretase wird ebenfalls von Furin aktiviert. Die β -Sekretase ist eine Aspartylprotease und an der Bildung von Amyloidplaques im Gehirn beteiligt. Diese Plaques werden mit der Entstehung der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht (Bennett et al., 2000).

Aufgrund vieler pathologischer Prozesse, an denen Furin oder eine furinartige PC's beteiligt sind, besteht ein großes Interesse an wirksamen Hemmstoffen dieser Proteasen. Diese Hemmstoffe könnten ein neuer Ansatzpunkt zur Behandlung dieser Krankheiten sein. Allerdings stehen dem Einsatz der Hemmstoffe die zahlreichen physiologischen Funktionen des Furins entgegen, die momentan noch nicht komplett verstanden worden sind.

2.2 Kristallstruktur des Furins

Um ein rationales, strukturbasiertes Design von Inhibitoren zu ermöglichen, ist die Kenntnis der Kristallstruktur des Zielenzyms notwendig. Die erste Struktur des Maus-Furins konnte 2003 im Komplex mit dem irreversibel bindenden Inhibitor Dec-RVKR-CMK gelöst werden (Henrich et al., 2003). Der Bindungsmodus dieses Inhibitors ist schematisch in Abbildung 2.3 auf Seite 32 dargestellt.

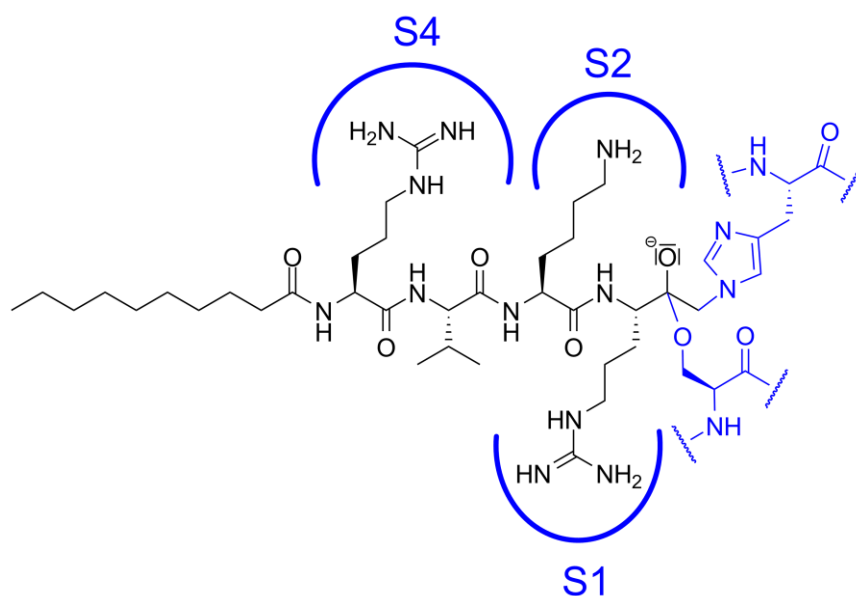


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung des Bindungsmodus des irreversiblen Inhibitors Dec-RVKR-CMK im Komplex mit Furin. Die katalytischen Aminosäuren Ser368 und His194 des Furins sind in blau dargestellt.

Der für die Kristallisation verwendete Inhibitor gehört zur Klasse der Chlormethylketone und wurde erstmals 1994 beschrieben (Garten et al., 1994). Das katalytische Serin greift unter Ausbildung eines Hemiketals den Carbonyl-Kohlenstoff des P1-Restes an. Daraufhin wird das Histidin der katalytischen Triade irreversibel durch die Chlormethylgruppe alkyliert und das Enzym im tetrahedralen Übergangszustand der katalysierten Reaktion fixiert (Powers et al., 2002). Die erhaltene Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,6 Å wurde in der PDB-Datenbank (1P8J.pdb) hinterlegt (Henrich et al., 2003) und ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

Bei dem für die Kristallisation verwendeten Maus-Furin handelt es sich um eine verkürzte Variante, die nur die Protease- und die P-Domäne umfasst. Die katalytische Domäne ähnelt in ihrem Aufbau dem bakteriellen Subtilisin und setzt sich aus einem antiparallelen und sieben parallelen β -Faltblattstrukturen sowie sieben α -Helices zusammen. Außerdem enthält sie zwei Disulfidbrücken und zwei Bindestellen für Ca^{2+} -Ionen. Eine der beiden Calciumbindestellen ist direkt unterhalb der S1-Tasche lokalisiert. Das hier gebundene Ca^{2+} -Ion wird heptagonal von Asp258, Glu331 (2x), Asp301 und drei Wassermolekülen koordiniert. Dieses pentagonal-bipyramidale Netzwerk stabilisiert die S1-Tasche in ihrer Konformation.

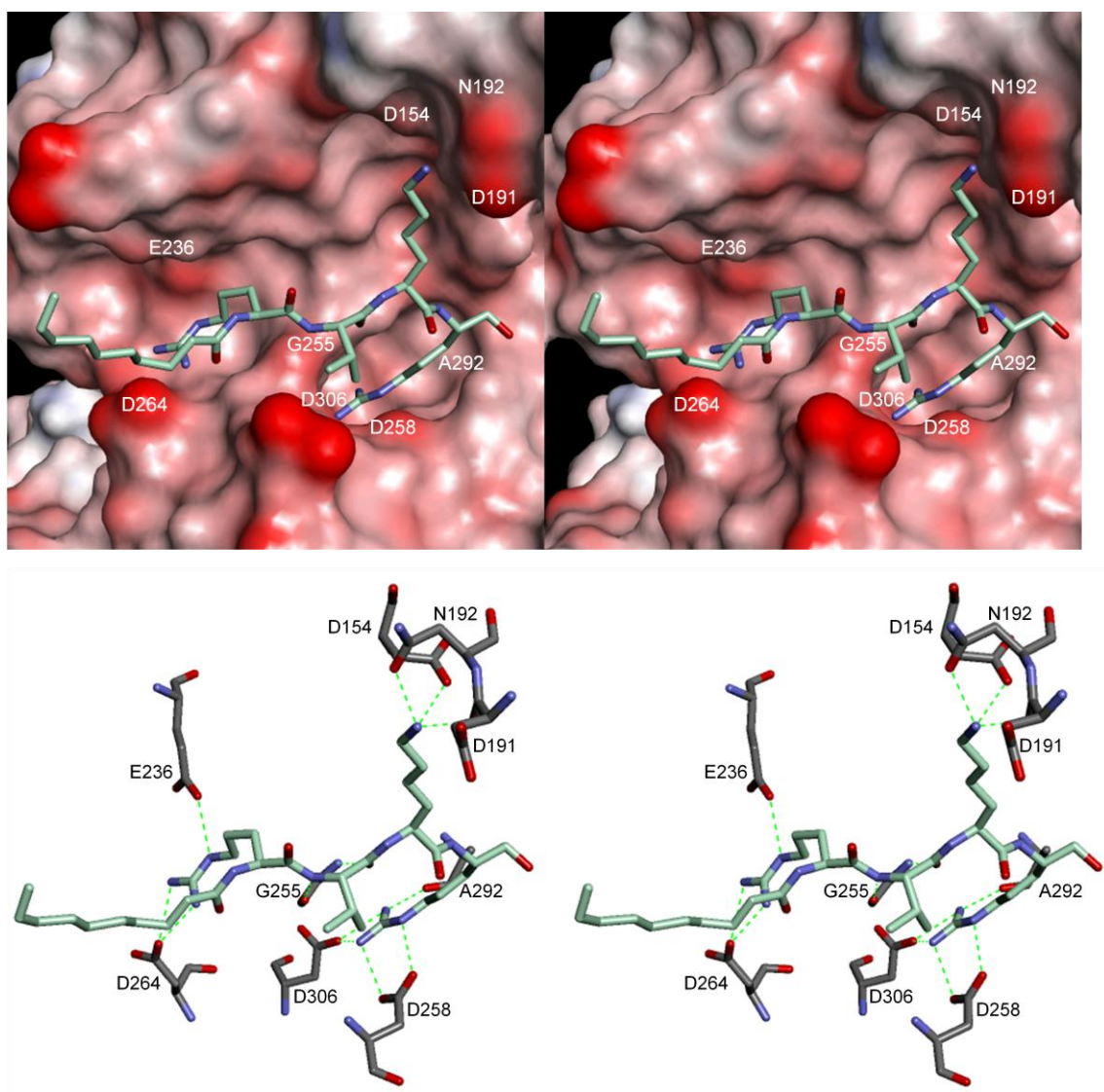


Abbildung 2.4 Stereobild des aktiven Zentrums des Furins im Komplex mit dem irreversiblen Inhibitor Dec-RVKR-CMK (Stab-Modell, Kohlenstoff hellgrün, Stickstoff blau und Sauerstoff rot).

Oben: Darstellung des Inhibitors vor der Oberfläche der katalytischen Domäne. Die Farbe der Oberfläche entspricht dem berechneten negativen (-10 kT/e, rot) und positiven (15 kT/e, blau) elektrostatischen Potential. Die Positionen der Aminosäuren, zu denen der Inhibitor Wechselwirkungen ausbildet, sind beschriftet.

Unten: Der Inhibitor im katalytischen Zentrum des Furins. Die Aminosäuren die Wechselwirkungen zu dem Inhibitor ausbilden sind als Stabmodell (Kohlenstoff: grau, Stickstoff blau und Sauerstoff rot) dargestellt, alle anderen Aminosäuren sind aus Gründen der Übersichtlichkeit ausgeblendet. Salz- oder H-Brücken sind als gestrichelte grüne Linien gezeigt. Die Abbildung ist im Gegensatz zur Oberen leicht gedreht, um relevante Wechselwirkungen besser darzustellen.

Am Boden der S1-Tasche befinden sich zwei negativ geladene Aspartatreste, an die der Inhibitor direkt bindet. Über ein Netzwerk von Wassermolekülen werden außerdem Wasserstoffbrücken von der Guanidinfunktion zu Pro256, Asp306 und Ala292 ausgebildet (Henrich et al., 2003). Es werden so spezifische Wechselwirkungen von allen drei Guanidinostickstoffen zum Furin oder zu Wassermolekülen in der S1-Tasche geformt.

All diese Wechselwirkungen sind mit Lysin nicht möglich, woraus sich die strikte Substratspezifität für Arginin in dieser Position erklärt. Die Aminofunktion des P2-Lysins wird in der S2-Tasche von Asp154 und Asn192 sowie der Carbonylfunktion des Asp191 komplexiert. In P3-Position zeigt das Valin in Richtung des Lösungsmittels, woraus sich die große Flexibilität des Furins für diverse Aminosäuresubstitutionen in diesem Bereich erklärt. An der Oberfläche des Enzyms befindet sich in räumlicher Nähe zu der Valinseitenkette allerdings die Carboxylfunktion des Glu257, die von einer basischen Aminosäure adressiert werden könnte. Dies ist in Übereinstimmung mit natürlichen Furinsubstraten, die teilweise basische Aminosäuren in P3-Position haben (Rockwell et al., 2002). Allerdings wurden in unserer Arbeitsgruppe hierzu widersprüchliche Ergebnisse gefunden. Eine Substitution des Valins in P3-Position von substratanalogen Inhibitoren durch Arg oder Lys verringerte die Affinität zu Furin sogar leicht (Becker et al., 2011). Die S4-Tasche wird durch die Carboxylfunktionen des Glu236 und Asp264 und die hydrophoben Seitenketten von Trp254 und Tyr308 definiert und kann deshalb von Arginin optimal besetzt werden. In einigen Furinsubstraten befindet sich jedoch in P4-Position kein Arginin. Diese fehlende basische Aminosäure wird von einem Arginin als P6-Rest ersetzt, wie z. B. auch in der zweiten Spaltstelle der Prodomäne des Furins.

Die P-Domäne besteht aus acht parallelen β -Faltblättern und stabilisiert die Struktur der katalytischen Domäne. Auf ihren Aufbau soll hier nicht detailliert eingegangen werden.

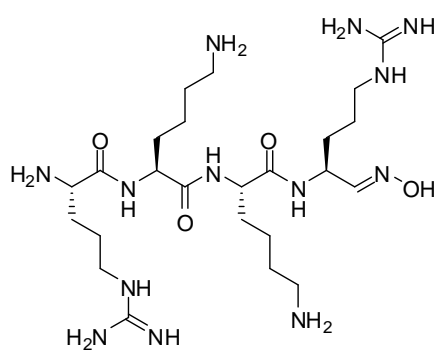
2.3 Bekannte Furininhibitoren

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Furininhibitoren unterschiedlicher Strukturtypen entwickelt, die im Folgenden zusammengefasst werden sollen.

Zu den makromolekularen proteinartigen Furininhibitoren gehört beispielsweise der Proteinase Inhibitor 8, ein endogenes Serpin mit zur Spaltstelle des Furins homologen Sequenzen. Er hemmt Furin mit einem K_i -Wert von 53 pM (Dahlen et al., 1998). Der endogene Proteaseinhibitor α_1 -Antitrypsin besitzt in nativer Form eine Spaltstelle für die neutrophile Elastase (Laskowski and Kato, 1980). In der Variante α_1 -Antitrypsin-Portland (α_1 -PDX) wurden an P4- und P1-Position durch Mutation Arginine eingeführt und dieses Peptid so in einen effizienten Furinhemmstoff ($K_i = 1,4$ nM) überführt (Jean et al., 1998). Durch Einbau von Furinsubstratsequenzen in andere peptidische Protease-

inhibitoren wurden weitere potente Furininhibitoren erhalten, z. B. Varianten der *Turkey ovomucoid third domain* und des Eglin C (Lu et al., 1993; Komiyama and Fuller, 2000). Die 83 Aminosäure lange Sequenz der Prodomäne des Furins wurde vollsynthetisch dargestellt und hemmt Furin kompetitiv im niedrigen nanomolaren Bereich (Basak et al., 2010). Jedoch besitzen alle proteinartigen Inhibitoren ein sehr hohes Molekulargewicht und sind deshalb als Kandidaten für eine Wirkstoffentwicklung eher ungeeignet. Es wurden daher Ansätze verfolgt, das Molekulargewicht der Inhibitoren zu verringern.

In einer Peptidbibliothek wurde das Hexapeptid H-Leu-Leu-Arg-Val-Lys-Arg-NH₂ identifiziert, das Furin mit einem K_i-Wert von 0,8 µM hemmt (Cameron et al., 2000). Das Peptid Nona-L-Arg inhibiert Furin mit einer Inhibitionskonstante von 42 nM, wohingegen das analoge Nona-D-Arg-NH₂ (K_i = 1,3 nM) deutlich wirksamer ist. Für Hexa-Arg-Verbindungen wurden vergleichbare Hemmkonstanten gefunden, unabhängig von der Konfiguration der Arginine (114 nM für Hexa-L-Arg und 106 nM für Hexa-D-Arg). (Cameron et al., 2000; Kacprzak et al., 2004). Es wurde vermutet, dass die Peptide in D-Konfiguration stabiler gegen Hydrolyse sind und somit eine neue Leitstruktur für eine Wirkstoffentwicklung darstellen könnten. Polyarginine zeigen *in-vivo* nur eine geringe Toxizität und werden trotz ihres stark basischen Charakters zellulär aufgenommen (Fuchs and Raines, 2006).



K_i = 55,4 µM

Abbildung 2.5 Struktur eines Inhibitors mit C-terminaler Oximfunktion.

Neben reinen Peptidderivaten wurden unterschiedlich funktionalisierte Analoga dargestellt (Garten et al., 1989; Hallenberger et al., 1992; Stieneke-Gröber et al., 1992). Wie bereits in Kapitel 2.2 erwähnt, wurde ein Chlormethylketoninhibitor verwendet, um die Kristallstruktur des Furins zu lösen (Henrich et

al., 2003). Eine ähnliche Strategie wurde mit C-terminalen Semicarbazon-, Aldehyd-, und Oximderivaten verfolgt (Basak, 2005). Die Strukturformel eines Oximinhibitors ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Der Nachteil dieser Inhibitoren ist, neben ihrer geringen Aktivität, die hohe Toxizität und die Instabilität unter physiologischen Bedingungen. So wurden für einen vergleichbaren Chlormethylketoninhibitor des Thrombins *in-vivo* Halbwertszeiten von lediglich zwei bis drei Minuten bestimmt.

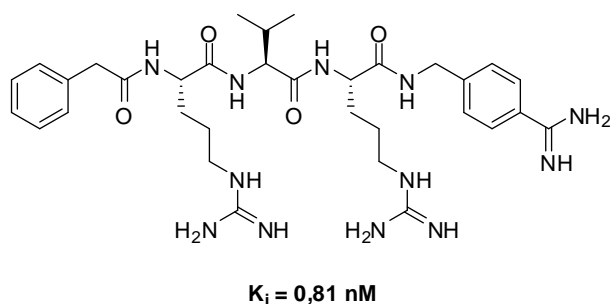


Abbildung 2.6 Struktur eines wirksamen Inhibitors mit einem C-terminalen Amidinobenzylamid.

In unserer Arbeitsgruppe wurden sehr effektive substratanaloge Furinhemmstoffe entwickelt. In diesen wurde das P1-Arginin durch verschiedene de-

carboxylierte Argininmimetika ersetzt. Das wirksamste Peptid aus einer ersten Serie hat die Sequenz Phenylacetyl-Arg-Val-Arg-4-Amidinobenzylamid und hemmt Furin mit einer Hemmkonstante von 0,81 nM (Abbildung 2.6). Es adressiert mit seiner Amidin-funktion die Seitenketten von Asp306 und Asp258 am Boden der S1-Tasche (Becker et al., 2010). Weiterentwicklungen dieses Inhibitorotyps mit einem basischen P5-Rest hemmen Furin mit Hemmkonstanten < 20 pM.

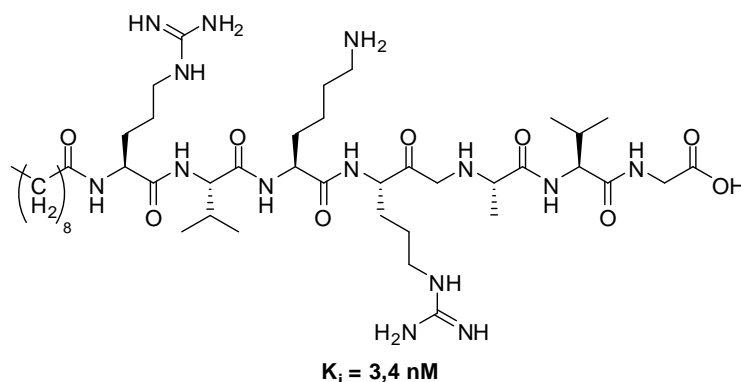


Abbildung 2.7 Struktur eines Inhibitors mit einer Ketomethylengruppe zwischen der P1- und der P1'-Aminosäure.

Wird die Peptidbindung zwischen der P1- und der P1'-Aminosäure in substratanalogen Inhibitoren durch eine Ketomethylengruppe ersetzt, kann das Peptid nicht mehr gespalten werden und es wirkt hemmend auf das Zielenzym. Die Carbonylgruppe wirkt als Elektrophil und wird durch das Serin im aktiven Zentrum angegriffen. Der wirksamste Hemmstoff dieser Serie (Abbildung 2.7) hemmt Furin mit einem K_i -Wert von 3,4 nM (Anglikar, 1995).

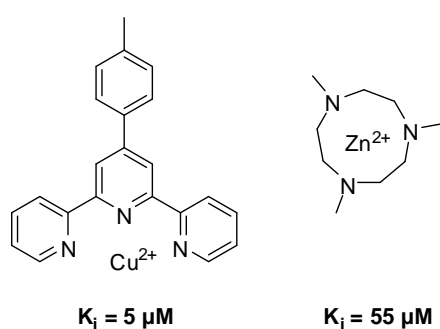


Abbildung 2.8 Beispiele für Chelatbildner als Furininhibitoren.

Im Bereich der nichtpeptidischen Inhibitoren wurden verschiedene Strukturen beschrieben. Verbindungen mit mehreren Pyridinringen oder Azakronenether chelatieren Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen und besitzen mikromolare Hemmwirkung auf Furin

(Abbildung 2.8). Interessanterweise zeigen die Chelatbildner mit einem komplexierten Metallion eine größere Hemmstärke als die unkomplexierten Verbindungen. Sie entfalten ihre Wirkung also offenbar nicht über die Komplexbildung der essentiellen Ca^{2+} -Ionen, der Wirkmechanismus ist jedoch unbekannt (Brinkerhoff et al., 2002; Podsiadlo et al., 2004).

Andrographolide sind Diterpene die aus *Andrographis paniculata*, einer traditionellen asiatischen Arzneipflanze, isoliert wurden. Diese Diterpene und davon abgeleitete Succinylester besitzen Hemmkonstanten im mikromolaren Bereich (Basak et al., 1999). Von Jiao wurden 2006 2,5-Dideoxystreptamine beschrieben, die bis zu sechs Guanidinogruppen tragen (Jiao et al., 2006). Das wirksamste Derivat mit vier Guanidino- und einem K_i -Wert von 6 nM ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Endiynylverbindungen mit Peptidsequenzen der Furinprodomäne (Abbildung 2.9, rechts) zeigen ebenfalls nanomolare Hemmkonstanten (Basak et al., 2009).

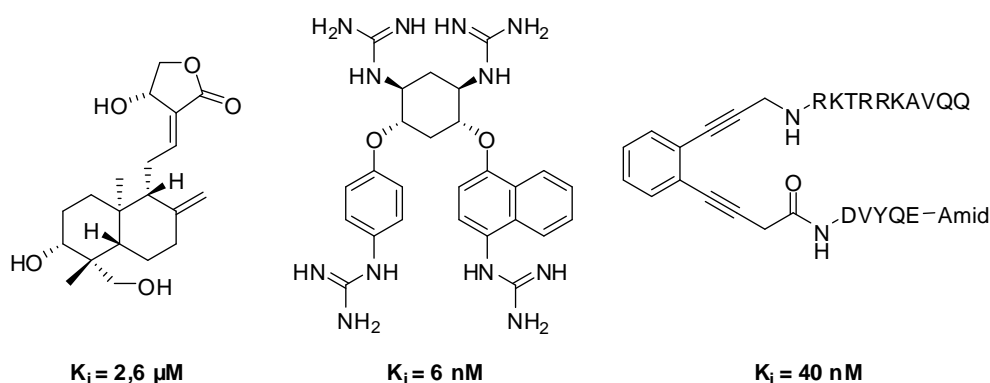


Abbildung 2.9 Beispiele weiterer Furininhibitoren aus verschiedenen Klassen. Links ist ein moderat wirksames Andrographolidderivat dargestellt. Das tetrabasische 2,5-Dideoxystreptamidinderivat (Mitte) ist der bisher wirksamste nichtpeptidische Furininhibitor. Die Chimäre aus Peptidsequenzen der Furinprodomäne mit einer Endiynylstruktur ist rechts dargestellt.

Im Rahmen eines HTS konnten mehrere potentielle Startpunkte für die Entwicklung niedermolekularer Furininhibitoren identifiziert werden (Komiya et al., 2009). Zu den gefundenen Strukturtypen zählen Dicoumaroylderivate und Fluoresceinanaloga. Daneben konnte auch ein Amidinohydrazonderivat mit einem K_i -Wert von 11,8 μM identifiziert werden (Abbildung 2.10).

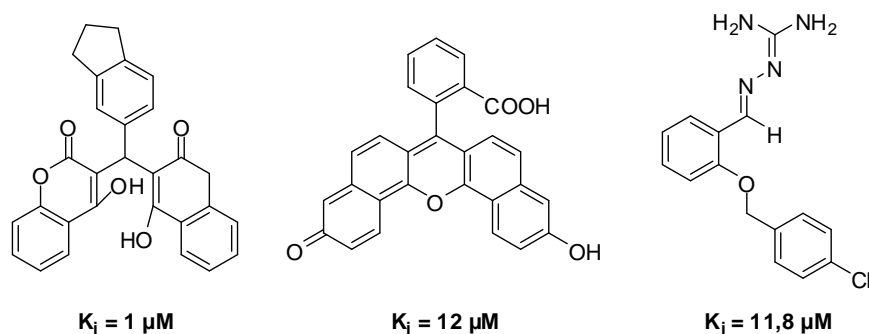


Abbildung 2.10 Strukturformel einiger durch HTS identifizierter Furininhibitoren. Links eine Dicoumaroylverbindung, in der Mitte ein Fluoresceinanalogon und rechts ein Amidinohydrazonderivat.

Vergleichbare Amidinohydrazonderivate wurden auch für die Entwicklung der Furininhibitoren genutzt, die im folgenden Abschnitt beschrieben ist.

3 Synthetisierte Inhibitoren des Furins

Durch ein *screening* mit Verbindungen, die von Dorian Bevec (Mondobiotec, Stans, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurden, wurde ein Bis-Amidinohydrazonderivat (MI-0007) als Furininhibitor identifiziert (Abbildung 3.1).

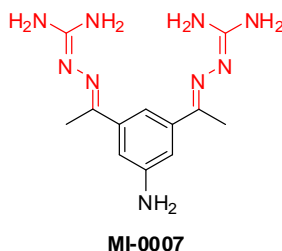


Abbildung 3.1 Strukturformel des Bis-Amidinohydrazonderivats MI-0007, die Amidinohydrazonpartialstrukturen sind rot hervorgehoben.

In einer ersten Serie wurden Inhibitoren in einer einstufigen Reaktion aus kommerziell erhältlichen Carbonylverbindungen dargestellt (Abschnitt 3.2). Der zweite Syntheszyklus umfasst Verbindungen, die durch Acylierung der Anilinfunktion der Leitstruktur MI-0007 erhalten wurden (Abschnitt 3.3). In der dritten Serie wurden dimerisierte Verbindungen untersucht (Abschnitt 3.4), während die abschließende vierte Serie Amidinohydrazonverbindungen umfasst, die mit unterschiedlichen Benzylethern derivatisiert sind (Abschnitt 3.5). Einige Inhibitoren mit anderen Strukturtypen sind in Abschnitt 3.6 zusammengefasst. Es folgen Untersuchungen zur Stabilität (Abschnitt 3.7), zum Bindungsmodus (Abschnitt 3.8) und zur Selektivität (Abschnitt 3.9) der synthetisierten Verbindungen. Zunächst wird die Verbindungsklasse der Amidinohydrazone in Abschnitt 3.1 näher erläutert.

3.1 Amidinohydrazonderivate

Das durch *screening* identifizierte Amidinohydrazonderivat MI-0007 hemmt Furin mit einem K_i -Wert von 1,8 μM . Ursprünglich wurde diese Verbindung als Wirkstoff gegen *Trypanosoma-brucei* Infektionen synthetisiert, dem parasitären Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit, jedoch nicht weiterentwickelt (Ulrich and Cerami, 1984).

Allerdings gibt es mit Guanabenz bereits eine Amidinohydrazonverbindung, die klinisch als α_2 -Agonist zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt wird (Baum et al.,

1969). Die Verbindung Semapimod (früher bekannt als CNI-1493) trägt vier Amidinohydrazongruppen und hat die klinische Phase II als anti-inflammatorischer Arzneistoff zur Therapie von Morbus Crohn erreicht (Loewenberg et al., 2005; Ulloa, 2005; Specht et al., 2008). Es ist jedoch unbekannt, ob die Verbindung derzeit weiterentwickelt wird. Die Strukturformeln von Guanabenz und Semapimod sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

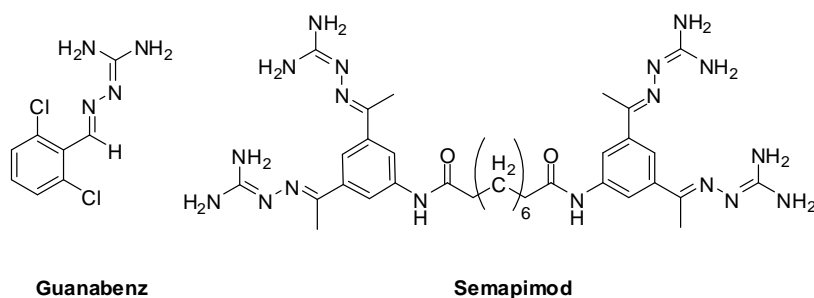


Abbildung 3.2 Strukturformeln des α_2 -Agonisten Guanabenz und des antiinflammatorischen Arzneistoffkandidaten Semapimod.

Bis auf wenige Ausnahmen besitzen die bisher bekannten Furininhibitoren mehrere stark basische Guanidino- oder Amidinogruppen (vgl. Kapitel 2.3). Diese sind im physiologischen pH-Bereich protoniert und werden deshalb in der Regel im menschlichen Verdauungstrakt nur schlecht resorbiert. Für die Leitstruktur MI-0007 wurde ein pK_a -Wert von 8,03 berechnet.² Somit ist sie wesentlich weniger basisch als vergleichbare Amidino- oder Guanidinoderivate, deren pK_a -Werte im Bereich von ca. 11-13 liegen. Der berechnete pK_a -Wert der Verbindung MI-0007 stimmt gut mit dem in der Literatur beschriebenen Wert für Guanabenz ($pK_a = 8,1$) überein (Soll et al., 2000). Trotzdem sollten die Amidinohydrazone mit ihrem basischen Charakter die sauren Aspartatreste am Boden der S1-Tasche adressieren können.

Die Amidinohydrazone sind durch säurekatalysierte Reaktion der entsprechenden Carbonylverbindung mit Aminoguanidin \times HCl synthetisch zugänglich (Ulrich and Cerami, 1984). Analoge acylierte Aminoguanidine können durch Reaktion von Säurechloriden mit Aminoguanidin \times H_2CO_3 in wasserfreiem Pyridin dargestellt werden (Bignon, 2002).

² Der pK_a -Wert wurde mit dem pK_a -plugin der Software MarvinSketch, ChemAxon Ltd. berechnet (Clark and Cahoon, 1987; Dixon and Jurs, 1993; Csizmadia et al., 1997).

3.1.1 Konfigurationsisomerie und Tautomerie der Amidinohydrazone

Bei der Entwicklung von Arzneistoffen ist die Bestimmung von Konfigurationsisomeren nach dem Thalidomidskandal in den Fokus gerückt. Auch bei der Umsetzung der Carbonylverbindungen mit Aminoguanidin tritt eine E-/Z-Isomerie auf. Deshalb wurden von Györgydeák Untersuchungen angestellt, um die Konfiguration von Amidinohydrazoneverbindungen zu bestimmen. So konnte einer Modellverbindung (Abbildung 3.3) mittels Kernresonanzexperimenten in DMSO- d_6 die E-Konfiguration zugeordnet werden (Györgydeák et al., 1999).

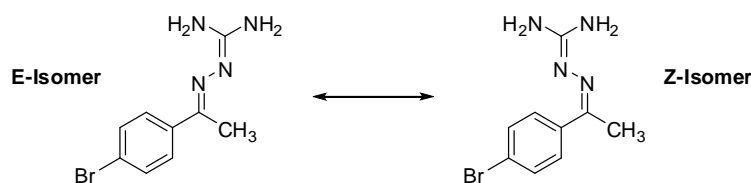


Abbildung 3.3 Darstellung des E- und des Z-Isomers einer Modellverbindung mit einer Amidinohydrazonefunktion. Mittels ^{13}C -NMR in DMSO- d_6 wurde festgestellt, dass die Verbindung bevorzugt in E-Konfiguration vorliegt. Für die Methylgruppe des E-Isomers wurde eine chemische Verschiebung von 13,0 ppm, für die des Z-Isomers eine Verschiebung von 24,2 ppm gemessen (Györgydeák et al., 1999).

Dieser Befund wurde durch röntgenkristallographische Untersuchungen bestätigt, in denen alle fünf kristallisierten Verbindungen in E-Konfiguration vorlagen. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass man in der Röntgenkristallographie nur eine Momentaufnahme des Moleküls erhält und deshalb nicht auf das vollständige Fehlen des Z-Isomers geschlossen werden darf. So haben Untersuchungen von Shearer am Guanabenz gezeigt, dass sich das E-Isomer unter Lichteinstrahlung teilweise in das Z-Isomer umwandeln kann (Shearer and DeAngelis, 1979).

Mittels der gelösten Kristallstrukturen wurde festgestellt, dass alle untersuchten Verbindungen flach, aber nicht perfekt planar sind. Die Amidinohydrazonegruppen zeigten in den untersuchten Kristallen eine Torsion von 11° - 29° in Relation zur Ebene des Phenylrings (Györgydeák et al., 1999).

Neben der beschriebenen Konfigurationsisomerie können die Amidinohydrazone in zwei tautomeren Formen vorliegen (Abbildung 3.4). In ^1H -NMR-Spektren (Lösungsmittel DMSO- d_6) wurden für die terminalen Amine jeweils zwei Singulettssignale mit der relativen Intensität zwei gefunden, was auf das bevorzugte Auftreten des terminalen Diaminotautomers in dem aprotischen Lösungsmittel DMSO- d_6 hinweist (Holzer and Györgydeák, 1992).

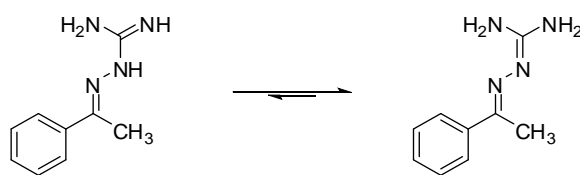


Abbildung 3.4 Darstellung beider tautomerer Formen einer Modellverbindung. In DMSO- d_6 liegt bevorzugt die Diaminomethylenform (rechts) vor.

In dieser Arbeit wird wegen der zuvor dargestellten Untersuchungsergebnisse davon ausgegangen, dass alle Verbindungen dieses Typs in E-Konfiguration mit zwei terminalen Aminen vorliegen. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die von uns durchgeführten enzymkinetischen Untersuchungen in wässrigen Medien stattfinden. Da die Amidinohydrazone hier teilweise protoniert vorliegen, kann die tatsächliche Lage des Gleichgewichts beider Tautomere von den vorgestellten Untersuchungen abweichen.

3.2 Erster Synthesesyklus – Unsubstituierte Amidinohydrazone und acylierte Aminoguanidine

Für den ersten Synthesesyklus wurden kommerziell erhältliche, aromatische Carbonylverbindungen eingesetzt, die durch säurekatalysierte Reaktion mit Aminoguanidin \times HCl zu den entsprechenden Amidinohydrazone umgesetzt wurden (Abbildung 3.5).

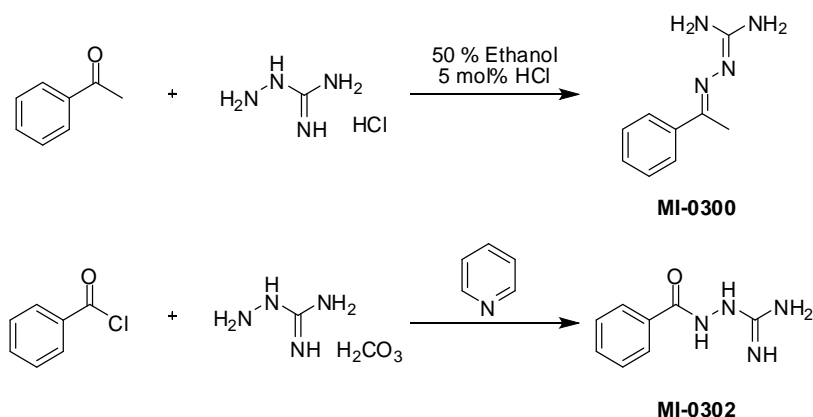


Abbildung 3.5 Synthese der Inhibitoren MI-0300 und MI-0302. Die weiteren Inhibitoren wurden auf analoge Weise hergestellt.

So wurden Derivate mit einer und zwei Amidinohydrazonegruppen erhalten. Außerdem wurden durch die Umsetzung von aromatischen Säurechloriden mit Aminoguanidin \times H_2CO_3 die entsprechenden acylierten Aminoguanidine hergestellt (Ulrich and Cerami, 1984; Bignon, 2002).

Die Ausgangsverbindung (**1**) zur Synthese des Inhibitors MI-0309 wurde durch Friedel-Crafts-Acylierung von Diphenylether mit Acetylchlorid und wasserfreiem Aluminiumchlorid als Katalysator gewonnen (Abbildung 3.6).

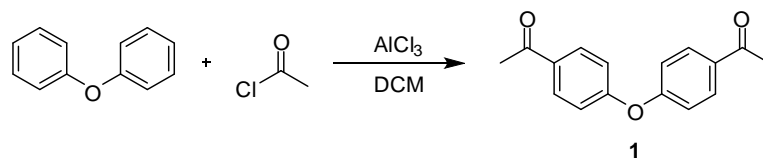


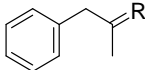
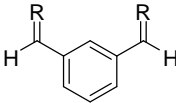
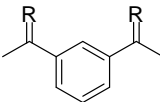
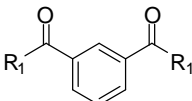
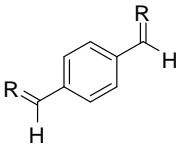
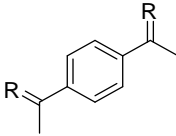
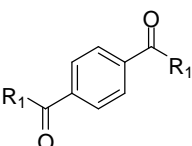
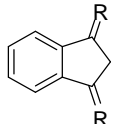
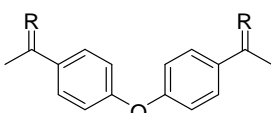
Abbildung 3.6 Synthese des Intermediats **1** über eine Friedel-Crafts-Acylierung des Diphenylethers.

Durch die Ethergruppe wird der einzuführende Acylrest in *ortho*- oder *para*-Position dirigiert. Die Verwendung eines vierfachen Überschusses von Aluminiumchlorid führte zu kurzen Reaktionszeiten und zu der angestrebten hohen Regioselektivität der Reaktion (Grützmaier et al., 1994). In ^1H -NMR-Untersuchungen des Reaktionsproduktes wurden zwei Dublettsignale bei 7,87 ppm und 6,92 ppm mit einer relativen Intensität von jeweils vier Protonen gefunden und das entstandene Produkt somit als di-*para*-Produkt identifiziert. Die Inhibitoren aus diesem ersten Syntheseyklus sind in Tabelle 3.1 zusammengestellt.

Tabelle 3.1 Hemmung des Furins durch mono- und bivalente Amidinohydrazoneverbindungen oder acylierte Aminoguanidinderivate. Obwohl alle Inhibitoren als Trifluoracetate oder als Hydrochloride vorliegen, sind die Strukturen zur Vereinfachung als freie Basen dargestellt. Die Salzformen der Inhibitoren können Kapitel 7 entnommen werden.

$$R = \begin{array}{c} \diagup \text{N} \diagdown \\ \text{N} = \text{C} = \text{NH}_2 \\ \text{NH}_2 \end{array} \quad R_1 = \begin{array}{c} \diagup \text{N} \diagdown \\ \text{H} - \text{N} - \text{C} = \text{NH}_2 \\ \text{NH} \end{array}$$

MI-	Formel	K_i (μM)
0300		273
0305		> 500
0302		376

0306		> 500
0356		12
0303		4,8
0304		28
0307		1,5
0301		1,8
0310		173
0308		17
0309		44

Die Bestimmung der K_i -Werte sämtlicher Verbindungen erfolgte analog bereits beschriebener Methoden (Kacprzak et al., 2004). Dabei wurde die Spaltung des Substrats Pyroglutamin-Arg-Thr-Lys-Arg-AMC fluorometrisch in Abhängigkeit von der Zeit gemessen und die erhaltenen *steady-state*-Geschwindigkeiten zur Berechnung der K_i -Werte nach Gleichung 1 (siehe Seite 130) verwendet. Parallel wurden bei jeder Messung die enzymkinetischen Parameter V_{\max} und K_m bestimmt. Verwendet wurden für die Messungen drei Substratkonzentrationen und mindestens sechs Inhibitorkonzentrationen. Diese wurden so gewählt, dass bei der höchsten Inhibitorkonzentration eine

Restaktivität des Enzyms von ca. 10 % gemessen werden konnte und dann in mehreren Stufen um mindestens eine Größenordnung verringert.

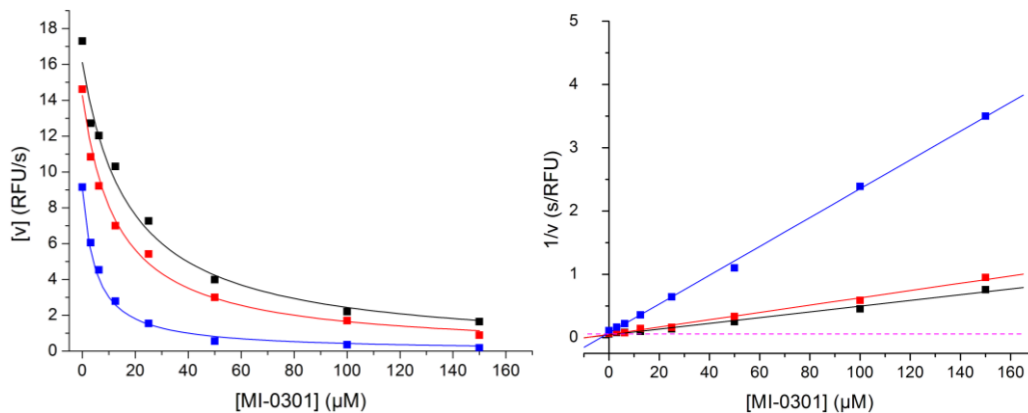


Abbildung 3.7 Bestimmung der Hemmkonstanten des Inhibitors MI-0301. Verwendete Substratkonzentrationen: schwarz $13 \mu M$, rot $8,125 \mu M$ und blau $3,25 \mu M$. Links: Bestimmte *steady-state*-Geschwindigkeit der Enzymreaktion als Funktion der Inhibitor-Konzentration. Die Kurven wurden nach Gleichung 1 an die Messwerte angepasst. Rechts: Reziproke Auftragung der Geschwindigkeit der Enzymreaktion als Funktion der Inhibitor-Konzentration nach Dixon. Die waagerechte, gestrichelte Linie entspricht $1/V_{max}$.

Alternativ zu der beschriebenen Methode kann der K_i -Wert mittels einer linearisierten Darstellung nach Dixon ermittelt werden (Dixon, 1953). Bei dieser Darstellung wird der reziproke Wert der ermittelten *steady-State*-Geschwindigkeit als Funktion der Inhibitor-Konzentration aufgetragen (Abbildung 3.7, rechts). Bei einem reversibel-kompetitiven Hemmmechanismus ergibt sich für jede Substratkonzentration eine Gerade. Der Schnittpunkt der Geraden liegt im II. Quadranten und der negative Abszissenabschnitt des Schnittpunktes entspricht dem K_i -Wert ($x = -K_i$). Zusätzlich kann in dieser Darstellung die Maximalgeschwindigkeit der Enzymreaktion (V_{max}) als Konstante aufgetragen werden. Die erhaltene Parallele zur Abszisse schneidet die anderen Geraden ebenfalls in dem gemeinsamen Schnittpunkt (Dixon, 1953).

Die Konzentration des durch Spaltung des Substrats entstandenen 7-Amino-4-methylcoumarins kann mittels einer Eichgeraden aus dem als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) erhaltenen Messsignal berechnet werden (Becker, 2011). Die Kenntnis der AMC-Konzentration ist jedoch für die Berechnung der K_i -Werte nicht notwendig und die *steady-state*-Geschwindigkeiten können auch in der Einheit RFU/s angegeben werden.

Die monovalenten Derivate MI-0300, MI-0305, MI-0302 und MI-0306 hemmen Furin relativ schwach mit K_i -Werten $> 250 \mu M$. Dieses Ergebnis ist erklärbar da bekannt ist,

dass Furinsubstrate mindestens zwei basische Gruppen für eine effektive Spaltung erfordern.

Die *meta*-substituierten Bis-Amidinohydrazoninhibitoren MI-0356, MI-0303 sowie das entsprechende acylierte Aminoguanidin MI-0304 zeigen eine moderate Hemmwirkung auf Furin. Von diesen drei Verbindungen wurde die stärkste Wirkung für den vom 1,3-Diacetylbenzol abgeleiteten Inhibitor MI-0303 gefunden (K_i -Wert 4,8 μM). Die *para*-substituierten Derivate des Terephthalaldehyds (MI-0307) und des 1,4-Diacetylbenzols (MI-0301) sind im Vergleich zu den *meta*-substituierten Verbindungen etwas wirksamer. Der vom Bis-Aldehyd abgeleitete Inhibitor MI-0307 besitzt eine Hemmkonstante von 1,5 μM und ist der wirksamste Furininhibitor aus dieser ersten Serie.

Die acylierten Aminoguanidine MI-0310 und MI-0304 zeigen deutlich niedrigere Affinitäten als die korrespondierenden Amidinohydrazone. Es wurden deshalb keine weiteren acylierten Verbindungen synthetisiert. Die aus einem 1,3-Indandion und dem Diphenyletherderivat (**1**) dargestellten Inhibitoren MI-0308 und MI-0309 hemmen Furin nur relativ schwach und wurden deshalb nicht weiter modifiziert.

Es wurde auch das Tris-Amidinohydrazon des 1,3,5-Triacetylbenzols hergestellt. Diese Verbindung ist jedoch in wässrigen Puffersystemen praktisch unlöslich und konnte deshalb nicht enzymkinetisch vermessen werden. Die Unlöslichkeit entsprechender Analoga wurde bereits in der Literatur beschrieben (Ruggli and Gassenmeier, 1939).

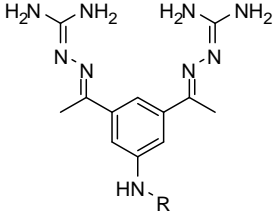
3.3 Zweiter Syntheszyklus – Modifizierungen an der Anilinfunktion der Leitstruktur MI-0007

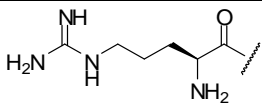
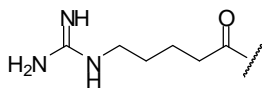
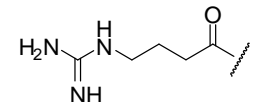
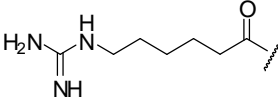
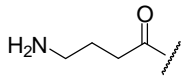
Die in diesem Abschnitt diskutierten Inhibitoren wurden von Prof. Dr. Torsten Steinmetzer für enzymkinetische Messungen zur Verfügung gestellt. Deshalb wird auf die Synthese dieser Verbindungen im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen.

Aus dem Vergleich vieler Substratsequenzen ist bekannt, dass Furin mindestens zwei, besser noch drei basische Aminosäuren benötigt, um diese effektiv zu spalten. Deshalb wurden in diesem zweiten Zyklus zusätzliche basische Reste in die Leitstruktur MI-0007 eingebaut. Dazu wurde die Anilinfunktion mit Arginin oder aliphatischen ω -Aminocarbonsäuren mit Kettenlängen von vier bis sechs Kohlenstoffatomen acyliert.

Die terminalen Aminogruppen wurden zusätzlich mit 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin in die Guanidine überführt. Die synthetisierten Verbindungen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2 Hemmung des Furins durch acylierte Derivate der Leitstruktur MI-0007.



MI-	R	K _i (μM)
0039		1,1
0041		1,0
0036		0,5
0037		1,4
0038		1,2

Die Kopplung von L-Arginin (MI-0039) erhöht im Vergleich zum freien Anilinderivat MI-0007 die Affinität kaum (1,1 μM im Vergleich zu 1,8 μM). Die α-Aminogruppe des Arginins trägt offenbar nicht zu einer stärkeren Wirksamkeit bei, da das desaminierte Analogon MI-0041 eine ähnliche Hemmstärke besitzt. Durch die Kopplung von 4-Aminobuttersäure an MI-0007 wurde Inhibitor MI-0038 mit einem K_i-Wert von 1,2 μM erhalten. Durch Guanylierung des terminalen Amins wurde die Hemmwirkung um den Faktor zwei verbessert. Mit einem K_i-Wert von 0,5 μM ist der Inhibitor MI-0036 die wirksamste Verbindung aus dieser Serie.

3.4 Dritter Syntheszyklus – Dimerisierte Inhibitoren

Guanylierte 2,5-Dideoxystreptaminderivate sind die derzeit wirksamsten nicht-peptidischen Inhibitoren des Furins (vgl. Kapitel 2.3). Die am stärksten wirksame Verbindung hemmt Furin mit einem K_i -Wert von 6 nM und trägt vier Guanidinogruppen (Jiao et al., 2006). Deshalb wurden in einer weiteren Serie Verbindungen mit bis zu vier Amidinohydrazongruppen synthetisiert.

Dazu wurde die Ausgangsverbindung MI-0007 über Malonsäure dimerisiert (MI-0035).³ Alternativ wurde Chloracetylchlorid als Ausgangsstoff für die Synthese weiterer Hemmstoffe verwendet. Dadurch wurde der Zugang zu asymmetrisch substituierten Inhibitoren möglich, indem zunächst das Säurechlorid an das Anilin gekoppelt wurde (Schritt 1, Abbildung 3.8). In einem zweiten Reaktionsschritt erfolgte die Umsetzung des aliphatischen Chloratoms in einer Williamson-Ether-Synthese mit Phenolen (Schritt 3, Abbildung 3.8). Durch Reaktion der synthetisierten Ausgangsverbindungen mit Aminoguanidin \times HCl wurden die finalen Inhibitoren erhalten.

Als repräsentatives Beispiel ist die Synthese des Inhibitors MI-0342 in Abbildung 3.8 dargestellt. Die Synthese der Ausgangsverbindung 3,5-Diacetylanilin erfolgte nach bekannten Literaturvorschriften (Ulrich and Cerami, 1984). Über eine Sandmeyer-Reaktion wurde das korrespondierende Phenol (**4**) erhalten. Dabei wurde das Anilin im ersten Schritt mit Natriumnitrit und Salzsäure in die entsprechende Diazoniumverbindung überführt. Unter Eliminierung von elementarem Stickstoff verblieb ein aromatisches Kation als reaktives Zwischenprodukt, welches mit Wasser zum Phenol weiterreagierte.

³ Die Verbindung wurde von Prof. Dr. Torsten Steinmetzer zur Verfügung gestellt und im Rahmen der vorliegenden Arbeit enzymkinetisch charakterisiert.

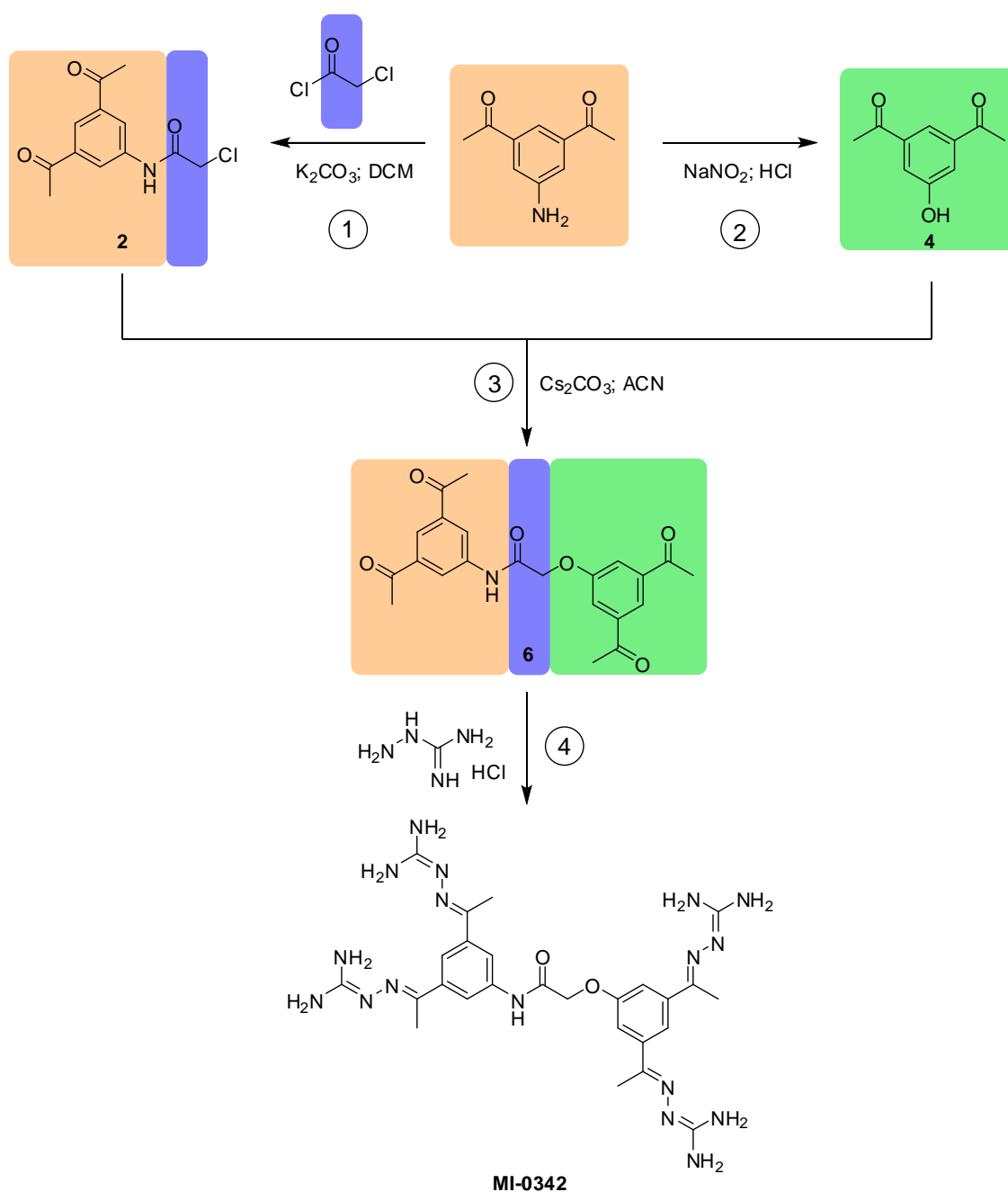


Abbildung 3.8 Synthese des Inhibitors MI-0342. (1) Im ersten Reaktionsschritt wird das Anilin durch das Säurechlorid acyliert. Das durch eine Sandmeyer-Reaktion (2) erhaltene Phenol wird unter Ausbildung einer Etherfunktion alkyliert (3). Im finalen Schritt erfolgt die Umwandlung der Carbonylgruppen in die Amidinohydrazone (4).

Die synthetisierten Inhibitoren (Tabelle 3.3) hemmen Furin mit Hemmkonstanten im Bereich von ca. 0,5 bis 5 μM , wobei allerdings keine Korrelation der Anzahl der Amidinohydrazonegruppen zum K_i -Wert erkennbar ist. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Jiao. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen guany-

lierten 2,5-Dideoxystreptaminderivaten war eine Korrelation der Hemmkonstanten mit der Anzahl der Guanidinogruppen ebenfalls nicht gegeben (Jiao et al., 2006).

Tabelle 3.3 Hemmung des Furins durch dimerisierte Amidinohydrazonderivate.

$$R = \begin{array}{c} \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \end{array} \text{N} = \text{C}(\text{NH}_2) \text{NH}_2$$

MI-	R	K _i (μM)
0035		1,1
0342		0,6
0339		5,6
0345		1,5
0346		1,9
0343		1,4

Der wirksamste Inhibitor MI-0342 aus dieser dritten Serie besitzt vier basische Substituenten, ist aber ähnlich wirksam wie das tribasische ω -Guanidinobuttersäurederivat MI-0036 aus der vorhergehenden Serie. Offenbar ist mindestens eine Amidinohydrazongruppe an dem phenolischen Phenylring für die Affinität von Bedeutung. Der Inhibitor MI-0339 mit einer unsubstituierten Phenoxygruppe weist im Vergleich zu seinem Analogon MI-0345, mit einer Amidinohydrazongruppe am Phenoxyrest, einen fast um den Faktor vier schwächeren K_i -Wert auf. Das Fehlen von Amidinohydrazongruppen am anilinischen Phenylring kann hingegen durch zwei Amidinohydrazone am Phenoxyrest des Moleküls kompensiert werden, so dass Inhibitor MI-0343 einen ähnlichen K_i -Wert wie die Verbindung MI-0345 besitzt.

Der Bindungsmodus der Verbindungen ist momentan noch unbekannt, da es bisher nicht gelungen ist, eine Kristallstruktur von Furin mit diesen Amidinohydrazoninhibitoren zu erhalten. Wir gehen jedoch davon aus, dass eine Amidinohydrazongruppe die S1-Tasche des Furins besetzt. Der Beitrag weiterer Amidinohydrazongruppen und die Präferenz für die Substitution am Phenoxyring können strukturell zurzeit nicht erklärt werden.

3.5 Vierter Synthesesyklus – Benzyletherderivate

Im vierten Synthesesyklus wurde eine andere Synthesestrategie verfolgt, da die bisher beschriebenen Versuche, die Hemmwirkung durch den Einbau zusätzlicher basischer Gruppen zu verbessern, nur geringen Erfolg hatten. In einem HTS (Komiya et al., 2009) wurde ein vom Salicylaldehyd abgeleitetes Amidinohydrazonderivat mit nur einer basischen Gruppe identifiziert, das Furin mit einer Hemmkonstante von 11,8 μM relativ wirksam inhibiert (vgl. Abbildung 2.10 auf Seite 38). Die Phenolfunktion des Salicylaldehyds ist zusätzlich mit einem *para*-Chlorbenzylether substituiert. Da die zuvor synthetisierten monovalenten Verbindungen (vgl. Tabelle 3.1) nur eine vernachlässigbare Hemmung mit K_i -Werten $> 250 \mu\text{M}$ zeigten, wurde der Einfluss der Benzylethergruppe auf die Affinität der Inhibitoren untersucht.

Im ersten Schritt der zweistufigen Synthese wurde die phenolische Hydroxygruppe des Salicylaldehyds mit einem Benzylbromidderivat, unter Zusatz von Kaliumiodid und wasserfreiem Kaliumcarbonat, in trockenem THF alkyliert (Lin et al., 2005). Das resul-

tierende Rohprodukt wurde nach einem Waschschrift mit Aminoguanidin \times HCl in das Amidinohydrazon umgewandelt (Abbildung 3.9).

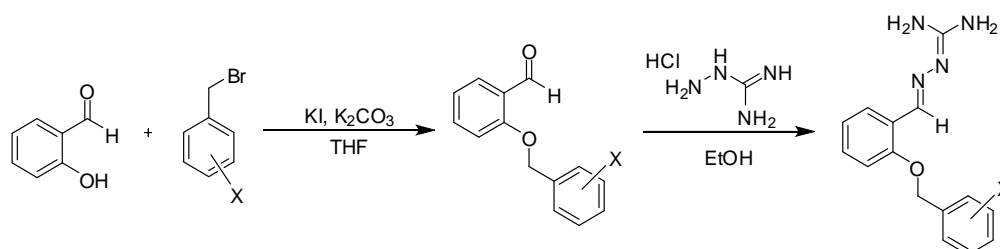


Abbildung 3.9 Synthese der von Salicylaldehydbenzylethern abgeleiteten monovalenten Inhibitoren.

Zusätzlich wurden drei Derivate (MI-0387 – MI-0389) des Salicylaldehyds synthetisiert, die über ein α,α' -Dibromxylol dimerisiert wurden und somit zwei Amidinohydrazongruppen tragen. Ihre Darstellung erfolgte analog zur Synthese der monovalenten Inhibitoren (Abbildung 3.10).

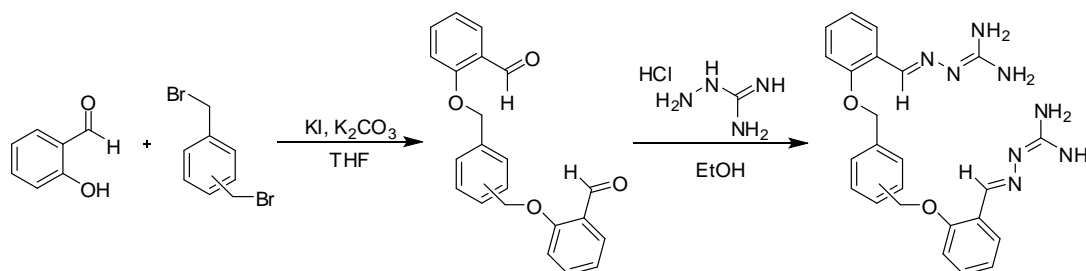


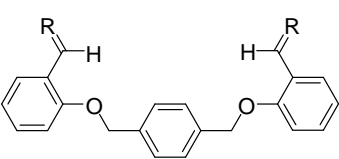
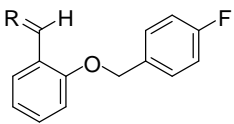
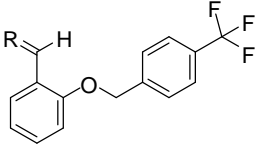
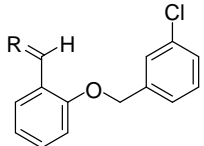
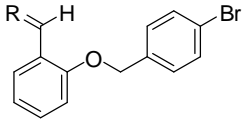
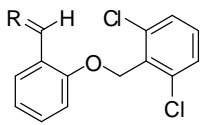
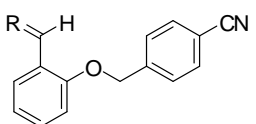
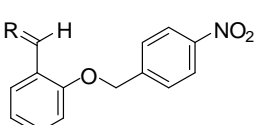
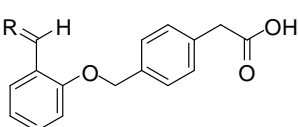
Abbildung 3.10 Synthese der mittels einer Xylolgruppe dimerisierten Inhibitoren MI-0387 – MI-0389.

Die Hemmkonstanten der Verbindungen aus dieser Serie sind in Tabelle 3.4 zusammengestellt. Die Inhibitoren MI-0348 bis MI-0350 leiten sich von 2-, 3- und 4-Hydroxyacetophenon ab und ihre jeweiligen Phenolfunktionen wurden, wie auch in der Referenzverbindung von Komiyama, mit 4-Chlorbenzylbromid derivatisiert. Alle drei Stellungsisomere zeigen nur eine schwache Hemmung des Furins ($K_i > 300 \mu\text{M}$). Als Referenz wurde außerdem der vom Salicylaldehyd abgeleitete Inhibitor MI-0359 synthetisiert. Der von uns bestimmte K_i -Wert von $25 \mu\text{M}$ liegt in der gleichen Größenordnung wie der in der Literatur beschriebene Wert von $11,8 \mu\text{M}$ (Komiyama et al., 2009). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in dieser Serie keine weiteren Derivate des Acetophenons dargestellt, sondern ausschließlich Salicylaldehyd als Grundgerüst verwendet.

Tabelle 3.4 Hemmung des Furins durch Amidinohydrazone derivate verschiedener Phenoxybenzylverbindungen und des Phenoxyethylnaphthalins.

$$R = \begin{array}{c} \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \end{array} \text{N} = \text{N} - \text{C}(\text{NH}_2) = \text{NH}_2$$

MI-	R	K _i (μM)
0348		> 500
0349		> 500
0350		313
0359		25
0384		54
0385		> 500
0386		13
0387		4,3

0388		147
0389		42
0390		> 500
0391		35
0392		38
0393		108
0394		72
0395		146
0398		97

Die in *para*-Position halogenierten Benzylether des Salicylaldehyds besitzen alle eine ähnliche Hemmwirkung, wobei das wirksamste Derivat die Referenzverbindung mit einer *para*-Chlorsubstitution ist. Eine vergleichbare Affinität weist Verbindung

MI-0391 mit einem Chloratom in *meta*-Position auf ($K_i = 35 \mu\text{M}$). Allerdings scheinen die Halogenatome die Bindungsstärke nur schwach zu beeinflussen, da auch eine unsubstituierte Benzylgruppe (MI-0384) lediglich einen um den Faktor zwei verringerten K_i -Wert im Vergleich zur wirksamsten Verbindung dieser Reihe aufweist.

Substituenten wie ein 4-Cyanobenzylether bei Inhibitor MI-0394 oder zwei Chloratome in *ortho*- und *para*-Position des Benzylrestes im Falle der Verbindung MI-0393 sind ungünstig für die Affinität. Die sterisch noch anspruchsvolleren Verbindungen MI-0385 mit einem Naphthylether und MI-0390 mit einem *para*-Trifluormethylbenzylether sind mit K_i -Werten $> 500 \mu\text{M}$ unwirksam. Ebenfalls weniger wirksam als der Inhibitor mit dem unsubstituierten Benzylether sind polare Substituenten wie eine Nitro- (MI-0395) oder eine Carboxylgruppe (MI-0398) in *para*-Position.

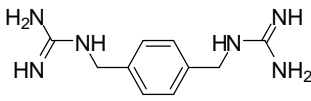
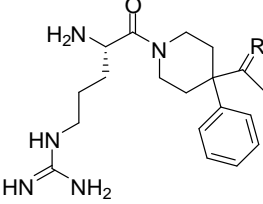
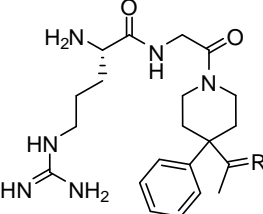
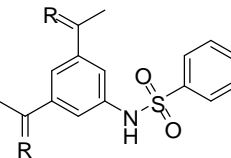
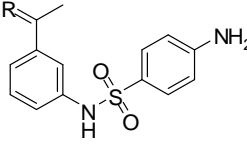
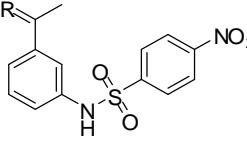
Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Benzylether einen eher kleinen, hydrophoben Bereich adressiert, jedoch ist der exakte Bindungsmodus dieser Verbindungen unbekannt. Zu berücksichtigen ist auch, dass gegebenenfalls nicht alle Inhibitoren dieser Serie mit dem Amidinohydrazon die S1-Tasche besetzen und somit unterschiedliche Bindungsmodi möglich sind.

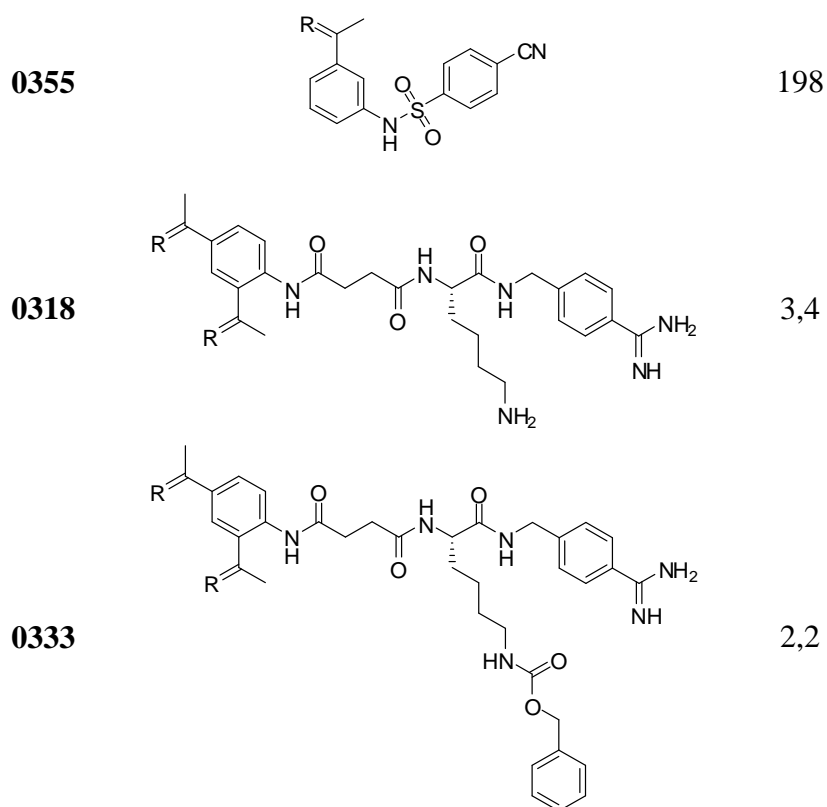
Der über ein *ortho*-Xylol dimerisierte Inhibitor MI-0387 mit zwei Amidinohydrazongruppen besitzt eine Hemmkonstante von $4,3 \mu\text{M}$ und ist damit ähnlich wirksam wie die Inhibitoren aus der ersten Serie. Das *para*-Xylolderivat MI-0388 hingegen hat im Vergleich zu dem *ortho*- und dem *meta*-Derivat eine mehr gestreckte Konformation und einen deutlich höheren K_i -Wert von $147 \mu\text{M}$.

3.6 Inhibitoren anderer Strukturtypen

Neben den vier bereits beschriebenen Serien wurden noch andere Grundbausteine zur Synthese der Inhibitoren verwendet. Die erhaltenen Verbindungen sind in Tabelle 3.5 zusammengestellt.

Tabelle 3.5 Hemmung des Furins durch weitere Inhibitoren.

MI-	R	K_i (μ M)
0319		500
0344		40
0347		25
0040		1,6
0351		84
0352		31



Aus Arbeiten zu substratanalogen Inhibitoren des Furins war bekannt, dass auch Verbindungen mit einem P1-Guanidinomethylphenylrest Furin im mikromolaren Bereich hemmen (Becker et al., 2010). Deshalb wurde *para*-Diaminoxylan mit 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin zum Bis-Guanidinderivat MI-0319 umgesetzt. Die Verbindung zeigt keine Hemmwirkung auf Furin bei der eingesetzten Konzentration von 1 mM. Da eine Adressierung der S1-Tasche mit einem solchen Motiv prinzipiell möglich sein sollte, kann offenbar keine zusätzliche Spezifitätstasche besetzt werden.

Das kommerziell erhältliche 4-Acetyl-4-phenylpiperidin wurde ebenfalls in das korrespondierende Amidinohydrazon umgewandelt und zur Besetzung weiterer Subtaschen der Piperidinring mit einem Arginin acyliert. In einem weiteren Inhibitor wurde zwischen dem Arginin und dem Piperidinring eine Glycinbrücke eingebaut. Für die erhaltenen Inhibitoren MI-0344 und MI-0347 konnten nur moderate K_i -Werte zwischen 25 und 40 μ M bestimmt werden. Deshalb wurde das 4-Acetyl-4-phenylpiperidin nicht weiter als Grundbaustein verwendet.

Die drei Inhibitoren mit der Sulfonamidgruppe greifen die Idee der monovalenten Inhibitoren aus dem vierten Syntheszyklus wieder auf. Der Inhibitor MI-0040 mit zwei Amidinohydrazonen und einem unpolaren Phenylsulfonamid hat einen K_i -Wert von $1,6 \mu\text{M}$. Die Rationale für die Synthese von MI-0351, MI-0352 und MI-0355 war, eine Amidinohydrazonfunktion durch ein polares Phenylsulfonamid zu ersetzen. Von diesen Derivaten ist Verbindung MI-0352 mit einem 4-Nitrophenylsulfonamid und einem K_i -Wert von $31 \mu\text{M}$ am wirksamsten.

3.7 Stabilitätsuntersuchungen

Für den α_2 -Agonisten Guanabenz wurden verschiedene Zersetzungsprodukte (Abbildung 3.11) beschrieben (Shearer and DeAngelis, 1979).

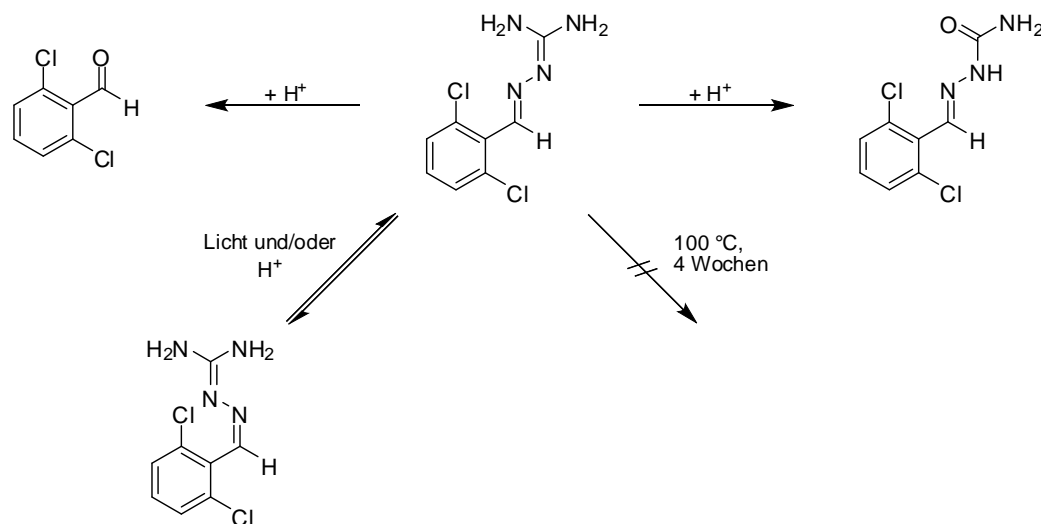


Abbildung 3.11 Stabilität von Guanabenz in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur und Lichteinstrahlung.

Im sauren Medium wurden die Rückreaktion zum entsprechenden 1,3-Dichlorbenzaldehyd und der Austausch des Iminstickstoffs gegen ein Sauerstoffatom unter Bildung eines Semicarbazons beobachtet. Guanabenz ist thermisch über vier Wochen bei 100°C sehr stabil und zeigt keinerlei Zersetzung. Unter Lichteinstrahlung, unabhängig vom pH-Wert der Lösung, erfolgt eine reversible Isomerisierung der Amidinohydrazongruppe. Dunkel gelagerte Lösungen isomerisieren nur im sauren Milieu.

Mittels UV-Spektroskopie können Guanabenz das E- oder das Z-Isomer zugeordnet werden. Die E-Form zeigt ein Absorptionsmaximum bei ca. 280 nm , die Z-Form hingegen zeigt eine wesentlich geringere Absorption bei dieser Wellenlänge. Ursächlich da-

für ist, dass das E-Isomer eine langgestreckte Form, das Z-Isomer hingegen eine gewinkelte Struktur einnimmt (Abbildung 3.12). Damit ergibt sich ein längeres konjugiertes π -Elektronensystem für die E-Form und eine stärkere Absorption im längerwelligen Bereich (Shearer and DeAngelis, 1979).

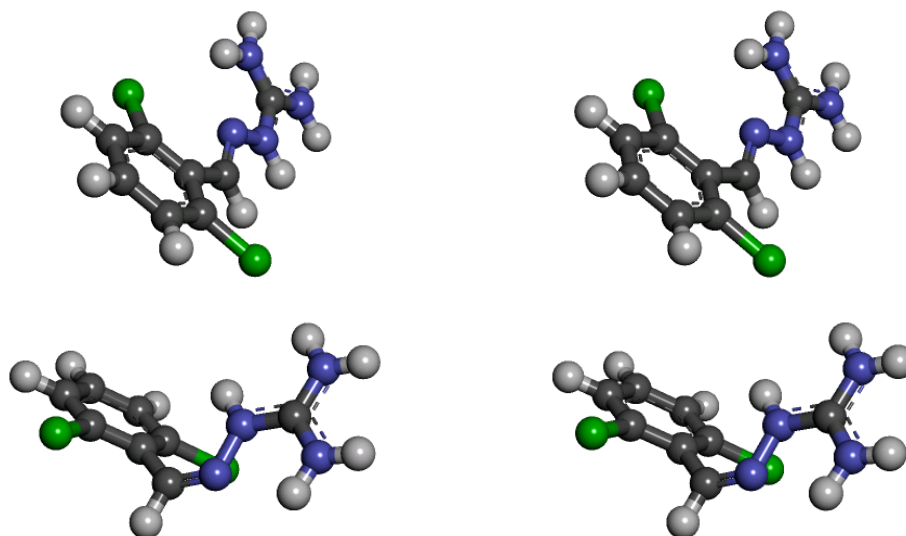


Abbildung 3.12 Stereobilder der energieminierten Strukturen des E- und Z-Isomers von Guanabenz als Ball- und Stickmodell. Kohlenstoffatome sind grau, Stickstoffatome blau, Chloratome grün und Wasserstoffatome hellgrau eingefärbt. Erkennbar ist die langgestreckte, beinahe planare Konformation des E-Isomers (oben) und die gewinkelte Konformation des Z-Isomers (unten).

Entsprechende Untersuchungen wurden auch mit den Inhibitoren MI-0301 und MI-0307 durchgeführt. Die Verbindungen MI-0301 und MI-0307 sind vom 1,4-Diacetylbenzol und vom Terephthalaldehyd abgeleitete bivalente Amidinohydrazonderivate (Tabelle 3.1 auf Seite 43). Beide Modellverbindungen wurden bei Raumtemperatur jeweils in 0,1 M Salzsäure und in Furin-Messpuffer pH 7,0 (vgl. Kapitel 7.2.2) inkubiert und über 15 Tage dem Tageslicht ausgesetzt. Die HPLC-Chromatogramme zu Beginn der Versuchsreihe wiesen nur einen Peak auf.

Im zeitlichen Verlauf wurde für die Inhibitoren jeweils ein charakteristisches Zersetzungsprodukt detektiert, das früher eluiert und damit eine hydrophilere Verbindung darstellt. Ausschnitte aus den analytischen HPLC-Chromatogrammen für die Ansätze in Messpuffer sind in Abbildung 3.13 dargestellt.

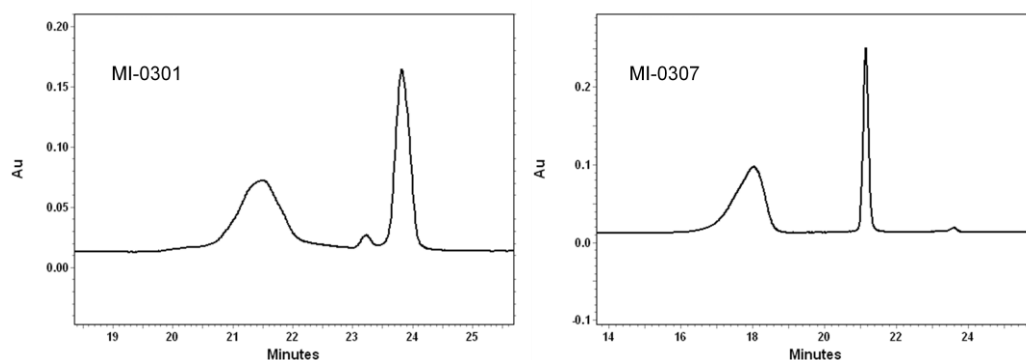


Abbildung 3.13 Ausschnitte der analytischen HPLC-Chromatogramme nach 15 Tagen Inkubation der Inhibitoren MI-0301 (links) und MI-0307 (rechts) in Messpuffer. Die spitzen Peaks mit einer höheren Retention stellen die Ausgangsverbindungen, die breiteren Peaks mit einer niedrigeren Retention stellen die Zersetzungsprodukte dar. Die Chromatogramme wurden unter den Standardbedingungen, wie in Abschnitt 7.1.3 beschrieben, entwickelt und bei einer Acetonitrilkonzentration von 1 % begonnen.

Für den Inhibitor MI-0307 ergaben sich in dem Ansatz mit 0,1 M HCl analoge Ergebnisse. Verbindung MI-0301 hingegen war in diesem sauren pH-Wert stabil, so dass keine Zersetzungsprodukte detektiert werden konnten. Die UV-Absorptionsspektren zu den jeweiligen Peaks sind in Abbildung 3.14 dargestellt.

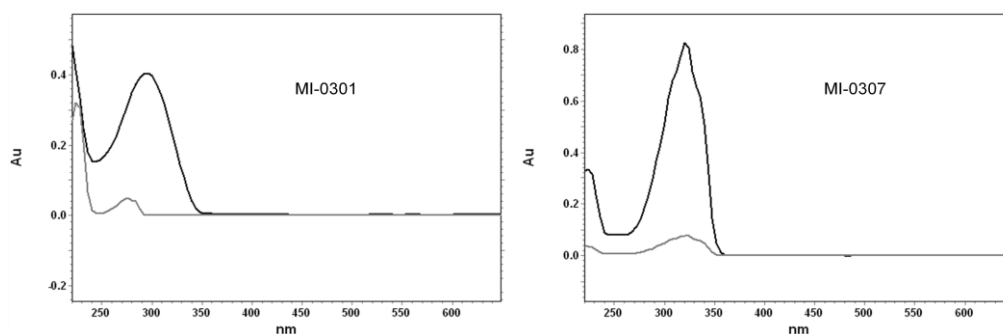


Abbildung 3.14 UV-Absorptionsspektren der Inhibitoren MI-0301 (links) und MI-0307 (rechts). Die schwarze Linie stellt das Spektrum der hydrophoberen Ausgangsverbindung, die graue Linie das Spektrum des hydrophileren Zersetzungsprodukts dar.

Es ist erkennbar, dass die jeweilige Ausgangsverbindung im Vergleich zu den Zersetzungsprodukten eine deutlich stärkere Absorption bei Wellenlängen um 300 nm aufweist. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Shearer and DeAngelis deutet dies auf eine teilweise Isomerisierung der Amidinohydrazone hin (Shearer and DeAngelis, 1979). Um das Vorliegen der korrespondierenden Semicarbazone auszuschließen, wurden mittels Massenspektrometrie die molekularen Massen der Verbindungen, die jeweils beiden Peaks der Chromatogramme in Abbildung 3.13 entsprechen, bestimmt. Da die molekularen Massen der Ausgangsverbindungen und der jeweiligen Zersetzungsprodukte identisch sind, konnte die Bildung der korrespondierenden Semicarbazone

ausgeschlossen werden. Zusammenfassend deuten die Untersuchungen darauf hin, dass durch eine Inkubation in wässrigen Puffersystemen bei pH 7,0 eine Isomerisierung der Amidinohydrazone stattfindet. Bereits nach drei Tagen sind ca. 50 % isomerisiert. Bei längerer Inkubationszeit bleibt das Verhältnis beider Spezies zueinander stabil, so dass auf das Vorliegen eines Gleichgewichts beider Isomere geschlossen werden kann.

3.8 Untersuchungen zum Bindungsmodus

Da Furin zwei saure Aspartatreste am Boden der S1-Tasche besitzt und aus der Kenntnis des Bindungsmodus des irreversiblen Inhibitors Dec-Arg-Val-Lys-Arg-CMK (Henrich et al., 2003), stand zu Beginn der Arbeit die Annahme, dass die moderat basischen Amidinohydrazone in der Lage sein sollten, in die S1-Tasche zu binden.

Zurzeit konnte noch keine Kristallstruktur von Furin mit Amidinohydrazon-Inhibitoren gelöst werden. Deshalb wurden mittels Docking mögliche Bindungsmodi mit ausgewählten Hemmstoffen unter Verwendung der bekannten Kristallstruktur des Furins (1P8J.pdb) bestimmt. Für den Inhibitor MI-0356 ($K_i = 12 \mu\text{M}$) konnte eine sinnvolle Dockinglösung erhalten werden, die in Abbildung 3.15 dargestellt ist. In sämtlichen 23 Dockinglösungen war die S1-Tasche von einer Amidinohydrazonfunktion besetzt, allerdings war die zweite basische Amidinohydrazonfunktion nur in sieben berechneten Strukturen in die S2-Tasche gerichtet. In den anderen Lösungen wurde sie in den Bereich um das katalytische Serin gelegt. Da in einigen berechneten Lösungen die Amidinohydrazone keine planare mit der sp^2 -Hybridisierung der Stickstoffe vereinbare Konformation eingenommen haben, wurde die Anzahl sinnvoller Lösungen weiter eingeschränkt.

In dem in Abbildung 3.15 ausgewählten Bindungsmodus sind die sp^2 -Stickstoffe planar, wobei die Amidinohydrazongruppen in der S1- und der S2-Tasche eine Torsion von $14,4^\circ$ bzw. $23,5^\circ$ gegenüber dem Phenylring aufweisen. Dieser Wert ist in Übereinstimmung mit den Kristallstrukturen ähnlicher Amidinohydrazonverbindungen von Györgydeák (vgl. Abschnitt 3.1.1 auf Seite 41).

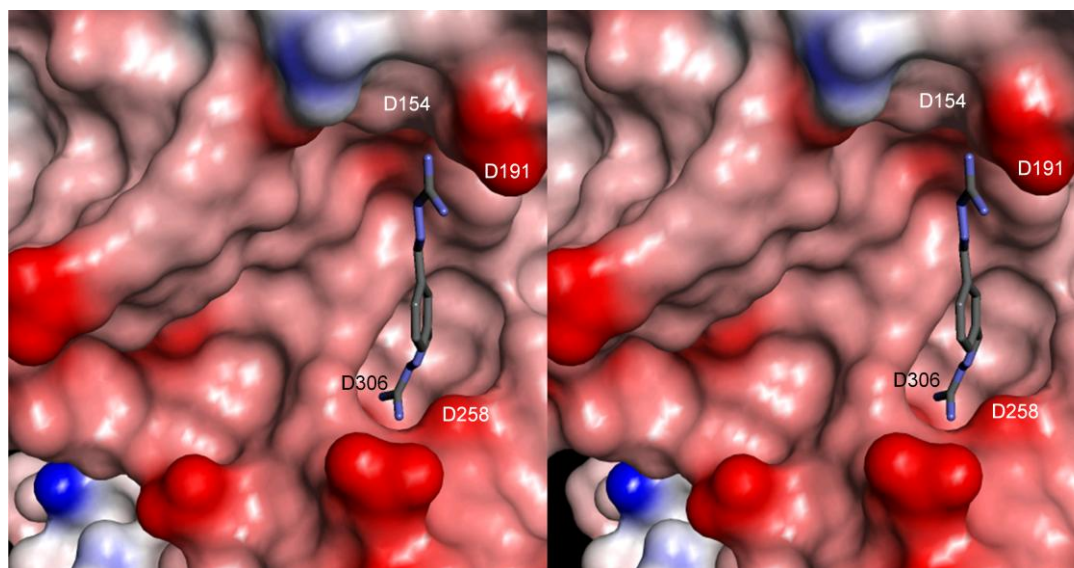


Abbildung 3.15 Stereobild der berechneten Konformation des Inhibitors MI-0356 im aktiven Zentrum des Furins (1P8J.pdb). Die Farbe der Oberfläche des Enzyms entspricht dem berechneten negativen (10 kT/e, rot) und positiven (-15 kT/e, blau) elektrostatischen Potential. Als *scoring*-Funktion wurde London-dG und *Forcefield* als *Refinement* verwendet. Die Positionen der Aminosäuren des Furins, zu denen der Inhibitor Wechselwirkungen ausbilden kann, sind beschriftet.

Die möglichen Wechselwirkungen des Inhibitors MI-0356 in der S1-Tasche und zum Vergleich die Seitenkette des Arginins aus dem Inhibitor Dec-RVKR-CMK, sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Es ist erkennbar, dass das Guanidin aus dem Arginin und das Amidinohydrazon ähnlich positioniert sind, so dass sich analoge Wechselwirkungen mit den Aminosäuren des Furins am Boden der S1-Tasche ergeben. Die Seitenketten von Asp258 und Asp306 sowie der Carbonylsauerstoff des Ala292 liegen in Entfernungen, die den typischen Längen von Wasserstoffbrückenbindungen entsprechen.

In der S2-Tasche liegen die Seitenketten von Asp154 in 3,4 Å und der Carbonylsauerstoff des Asp191 in 2,7 Å Entfernung und damit innerhalb der Bindungslänge von Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 3.17).

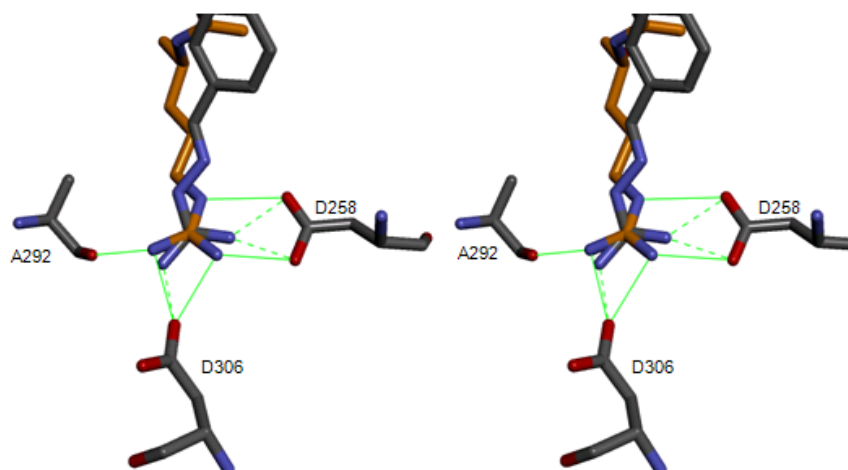


Abbildung 3.16 Stereobild der berechneten Position des Inhibitors MI-0356 in der S1-Tasche des Furins. Mögliche Interaktionen zu den Aminosäuren an der Enzymoberfläche sind mit gestrichelten grünen Linien dargestellt. Überlagert ist der Inhibitor Dec-RVKR-CMK aus der Kristallstruktur mit braunen Kohlenstoffen. Die grünen Linien stellen mögliche Interaktionen des Arginins aus dem kovalenten Inhibitor zu den Aminosäuren des Furins dar.

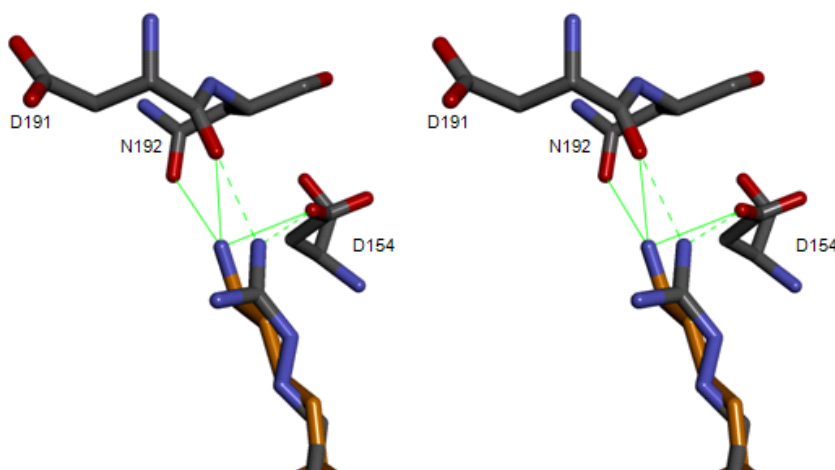


Abbildung 3.17 Stereobild der berechneten Position des Inhibitors MI-0356 in der S2-Tasche des Furins. Mögliche Interaktionen zu den Aminosäuren an der Enzymoberfläche sind mit gestrichelten grünen Linien dargestellt. Überlagert ist der Inhibitor Dec-RVKR-CMK aus der Kristallstruktur mit braunen Kohlenstoffen. Die grünen Linien stellen mögliche Interaktionen des Lysins aus dem kovalenten Inhibitor zu den Aminosäuren des Furins dar.

In einer letzten Untersuchungsreihe sollte der Bindungsmodus der Inhibitoren mit verschiedenen substituierten Benzylethern untersucht werden. Dazu wurden mögliche Positionen des wirksamsten Vertreters aus der Serie (MI-0359) und eines nicht wirksamen Vertreters (MI-0390) berechnet (Tabelle 3.4 auf Seite 53). Die Amidinohydrazongruppen beider Verbindungen haben bevorzugt die S1-Tasche besetzt. Es ergaben sich jedoch keine eindeutigen Hinweise auf Wechselwirkungen der halogenierten Benzylethergruppen, für deren Ausrichtung mehrere Möglichkeiten gefunden wurden.

In den meisten Fällen zeigte die Benzylethergruppe in den zentralen Bereich zwischen S1- und S2-Tasche. In den anderen Fällen wies sie entweder in Richtung des Lösungsmittels oder in Richtung der S1'-Tasche. Es konnte jedoch kein eindeutiger Interaktionspartner für das aromatische Chloratom bestimmt werden. Durch die Dockinglösungen ist auch nicht erklärbar, warum Verbindung MI-0390 mit einer Trifluormethylgruppe deutlich weniger wirksam ist.

3.9 Untersuchungen zur Selektivität

Bei der Entwicklung von potenziellen Arzneistoffen steht auch die Untersuchung der Selektivität der synthetisierten Verbindungen im Fokus. Im Allgemeinen wird nur die Hemmung des Zielenzym angestrebt, um Nebenwirkungen möglichst zu vermeiden.

Für die Untersuchung der Selektivität wurden die trypsinartigen Serinproteasen aus der Chymotrypsin-Subfamilie Thrombin, Faktor Xa und Plasmin sowie bakterielles Subtilisin verwendet. Thrombin und Faktor Xa gehören zur Blutgerinnungskaskade und sind an der Hämostase beteiligt, Plasmin hingegen ist für die Fibrinolyse verantwortlich. Subtilisin gehört wie Furin zur Familie S8 der Serinproteasen (Rawlings et al., 2010) und wurde deshalb für Selektivitätsuntersuchungen ausgewählt.

Für diese Untersuchungen wurden verschiedene Inhibitoren ausgewählt. Aus der ersten Syntheserie wurden die drei *para*-substituierten Inhibitoren (MI-0301, MI-0307, MI-0310) und der wirksamste dimerisierte Vertreter aus der dritten Serie (MI-0342) mit Thrombin vermessen. Nur Inhibitor MI-0342 hemmt Thrombin mit einem K_i -Wert von 0,9 μM , die drei anderen Verbindungen zeigen eine Hemmkonstante $> 60 \mu\text{M}$.

Die Inhibitoren MI-0036 bis MI-0041 wurden neben Thrombin auch mit Plasmin und Faktor Xa untersucht. Mit Ausnahme von MI-0040 ($K_{i(\text{Thrombin})} = 32 \mu\text{M}$) zeigen alle anderen Verbindungen keine signifikante Thrombinaffinität. Faktor Xa wird nur von dem potentesten Derivat (MI-0017) mit einem K_i -Wert von 16 μM gehemmt, alle anderen Inhibitoren zeigen für Faktor Xa geringere Affinitäten. Plasmin wird von allen vermessenen Inhibitoren nicht bzw. nur sehr schwach gehemmt (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6 Hemmkonstanten von ausgewählten Inhibitoren für die Serinproteasen Thrombin, Faktor Xa und Plasmin. Zum Vergleich sind die K_i -Werte für Furin angegeben.

MI-	K_i (μ M)			
	Thrombin	Faktor Xa	Plasmin	Furin
0036	800	16	1000	0,5
0037	1000	1000	1000	1,4
0038	1000	1000	110	1,2
0039	1000	1000	1000	1,1
0040	32	80	400	1,6
0041	1000	1000	1000	1,0
0301	786	n.b.	n.b.	1,8
0307	68	n.b.	n.b.	1,5
0310	1000	n.b.	n.b.	173
0342	0,9	n.b.	n.b.	0,6

n.b. nicht bestimmt

Für das Enzym Subtilisin wurden aufgrund der vernachlässigbaren Hemmung lediglich prozentuale Hemmraten, bezogen auf die maximale Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms, berechnet. Vermessen wurden aus der ersten Inhibitorserie die von den jeweiligen Ketonen bzw. Aldehyden abgeleiteten *para*- (MI-0301 und MI-0307) und *meta*-substituierten (MI-0303 und MI-0356) Bis-Amidinohydrazonderivate. Außerdem wurden die Hemmraten des mit einer ω -Guanidinobuttersäure acylierten Inhibitors MI-0036 aus der zweiten Serie und der mit einem Malonyllinker dimerisierten Verbindung MI-0035 bestimmt. Die wirksamsten Verbindungen bewirken bei der verwendeten Inhibitorkonzentration von 80 μ M eine Hemmung von ca. 8 % (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7 Prozentuale Hemmung von bakteriellem Subtilisin durch ausgewählte Inhibitoren.

MI-	Prozentuale Hemmung (Subtilisin)	K_i (μM) Furin
0035	7,7 %	1,1
0036	7,9 %	0,5
0301	7,9 %	1,8
0303	0 %	4,8
0307	0 %	1,5
0356	4,4 %	12

Alle untersuchten Amidinohydrazone sind nur relativ schwache Inhibitoren der vier getesteten Proteasen. Obwohl Thrombin, Faktor Xa und Plasmin eine starke Präferenz für Inhibitoren mit einem Arginin in P1-Position haben, zeigt auch Inhibitor MI-0039, der mit einem Arginin substituiert ist, keine Affinität zu den Proteasen. Im Gegensatz zu der S1-Tasche des Furins kann diese Tasche im Falle der trypsinartigen Serinproteasen offenbar nicht von den Inhibitoren besetzt werden. Nur die Verbindung MI-0342 inhibiert Thrombin etwas stärker im submikromolaren Bereich. Der Bindungsmodus dieser Verbindung in Thrombin ist jedoch unbekannt.

Die Hemmwirkung der getesteten Inhibitoren auf bakterielles Subtilisin ist zu schwach, so dass keine Affinitätskonstanten bestimmt werden konnten. Die errechnete prozentuale Hemmung ist entsprechend gering und kann mit den Unterschieden erklärt werden, die Furin und Subtilisin an ihre Substrate stellen. Während Furin, wie zuvor beschrieben, mindestens zwei bis drei basische Reste in Inhibitoren und Substraten für eine gute Affinität benötigt, akzeptiert Subtilisin in P4- und P2-Position keine basischen Reste. In P1-Position werden Arginin und Lysin akzeptiert, es besteht jedoch eine Präferenz für nicht basische Aminosäuren (Rawlings et al., 2010).

4 Human Airway Trypsin like Protease – HAT

4.1 Einführung

Die Serinprotease HAT wurde erstmals im Sputum von Patienten mit chronischer Bronchitis identifiziert (Abschnitt 4.1.1). Sie gehört zur Klasse der Typ-II-Transmembraserinproteasen, die sich in vier Unterfamilien aufteilt (Abschnitt 4.1.2). Neben der membrangebundenen HAT, die z. B. auf der Oberfläche zilientragender Zellen der Trachea lokalisiert ist, wurde auch eine durch *shedding* gebildete lösliche Form nachgewiesen (Abschnitt 4.1.3). Eine Übersicht über bisher bekannte Inhibitoren und Substrate der HAT geben die Abschnitte 4.3 und 4.4. Ihre exakte physiologische Funktion ist noch unbekannt; pathophysiologisch ist sie möglicherweise am Entzündungsgeschehen (Abschnitt 4.1.4) und der Spaltung des Hämagglutininprecursors von Influenzaviren beteiligt (Abschnitt 4.5). Zur Behandlung der Virusgrippe sollten deshalb prinzipiell HAT-Hemmstoffe einsetzbar sein. Da bisher nur wenige Inhibitoren der HAT beschrieben worden sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals substratanaloge Amidinoderivate als HAT-Inhibitoren entwickelt und charakterisiert. Zur Verdeutlichung des Bindungsmodus dieser Inhibitoren wurde ein Homologiemodell der HAT erstellt (Abschnitt 4.2).

4.1.1 Identifizierung der HAT

Im eitrigen Sputum von Patienten mit chronischer Bronchitis und bronchialem Asthma wurde 1997 durch Zugabe des Trypsinsubstrats Boc-Phe-Ser-Arg-AMC eine proteolytische Aktivität nachgewiesen. Durch Gelfiltration wurde festgestellt, dass diese Aktivität nur in Fraktionen mit einem Molekulargewicht von 27 kDa auftritt (Yasuoka et al., 1997).

Zur Isolierung der Protease wurde das rohe Sputum einem dreistufigen Aufreinigungsprozess unterzogen. Nach einer Ionenaustauschchromatographie folgte eine Affinitätschromatographie mit einer Benzamidin-Sepharose-Säule. Das Enzym wurde mit einem Acetatpuffer pH 4,0 eluiert und anschließend durch Größenausschluss-

chromatographie gereinigt. Aus 900 mL rohem Sputum konnten so 7 µg der aktiven Protease gewonnen werden (Yasuoka et al., 1997).

Durch Sequenzierung wurde bestimmt, dass ein 20 Aminosäuren umfassender N-terminaler Bereich dieser Protease homolog zu humanem Trypsin und anderen trypsinartigen Proteasen ist. Über die bekannte Nukleotidsequenz dieses Bereichs konnte die cDNA der Protease synthetisiert und so die Primärstruktur des Enzyms aufgeklärt werden (Yamaoka et al., 1998). Die 1254 Nucleotide codieren für 418 Aminosäuren.⁴ Der erwähnte 20 Aminosäuren umfassende, N-terminale Bereich der Proteasedomäne erstreckt sich in der Primärstruktur von Ile187 bis Leu206, so dass zwischen dem Arg186 und Ile187 eine Spaltung des Zymogens erfolgt sein müsste. Später wurde festgestellt, dass nach der Spaltung beide Teile der Protease über eine Disulfidbrücke verbunden sind und in der Membran verankert bleiben (Hooper et al., 2001; Takahashi et al., 2001). Erst eine zweite Spaltung, das sogenannte *shedding*, führt zu der löslichen Form der HAT, die ursprünglich im Sputum der Patienten entdeckt wurde. Der Protease wurde aufgrund ihrer Homologie zu Trypsin und ihres Auftretens in den Atemwegen der Name *human airway trypsin-like protease* (HAT) gegeben (Yasuoka et al., 1997).

Der proteolytisch nicht aktive Teil der Protease beinhaltet einen ungeladenen, hydrophoben Bereich (Aminosäuren 13 bis 43), der typisch für Transmembrandomänen ist und von Arg12 und Asp44 flankiert wird. Um zu bestimmen, ob der Bereich C- oder N-terminal der Transmembrandomäne ins Cytosol gerichtet ist, wurde jeweils die Summe der Ladungen in einem sich an die Transmembrandomäne anschließenden 15 Aminosäuren umfassenden Abschnitt bestimmt. Da in dem Abschnitt N-terminal der Transmembrandomäne ein positiver Ladungsüberschuss vorliegt, stellt dieser Bereich die zytosolische Domäne dar. Die katalytische Domäne ist somit extrazellulär lokalisiert; damit gehört HAT zu den Typ-II-Transmembran-Serinproteasen (Yamaoka et al., 1998).

In Ratten wurde ein homologes Enzym identifiziert, die *adrenal secretory protease* (AsP). Die AsP ist wesentlich kleiner als HAT, besitzt keine Transmembrandomäne und stellt eine Splicevariante dar. Sie ist möglicherweise an der Entstehung von Tumoren der Nebennierenrinde beteiligt; in menschlichen Tumoren konnte die AsP jedoch nicht

⁴ Um eine Kennzeichnung der N-terminalen Bereiche zu ermöglichen, bezieht sich in diesem Abschnitt die Nummerierung der Aminosäuren auf das Zymogen der HAT.

nachgewiesen werden. Es wird jedoch vermutet, dass eine Protease aus der HAT-Subfamilie, die DESC-1, ähnliche Funktionen wie die AsP im menschlichen Körper übernimmt (Bicknell et al., 2001; Hansen et al., 2004; Hahner et al., 2005).

Die katalytische Triade der HAT setzt sich aus His227(57)⁵, Asp 272(102) und Ser368(195) zusammen. Damit gehört HAT zur Familie der chymotrypsinartigen Endoproteasen (Subfamilie S1, Uniprot *accession-code* Q8VHJ4, Merops-Code S01.047). In der Literatur werden für HAT auch die Synonyme *adrenal secretory serine peptidase* und TMPRSS11D verwendet (Rawlings et al., 2010).

4.1.2 Klasse der Typ-II-Transmembranserinproteasen (TTSP II)

Im Menschen umfasst die Klasse der Typ-II-Transmembranserinproteasen zurzeit 19 Mitglieder. Außerdem wurden in allen Wirbeltieren und in einer Drosophila-Art Vertreter dieser Klasse gefunden (Antalis et al., 2011).

Die Transmembranserinproteasen vom Typ II werden in vier Subfamilien unterteilt: die HAT/DESC-, die Hepsin/TMPRSS-, die Matriptase- und die Corinsubfamilie. In Abbildung 4.1 ist der schematische Aufbau der HAT, der TMPRSS2, der Matriptase und der AsP dargestellt.

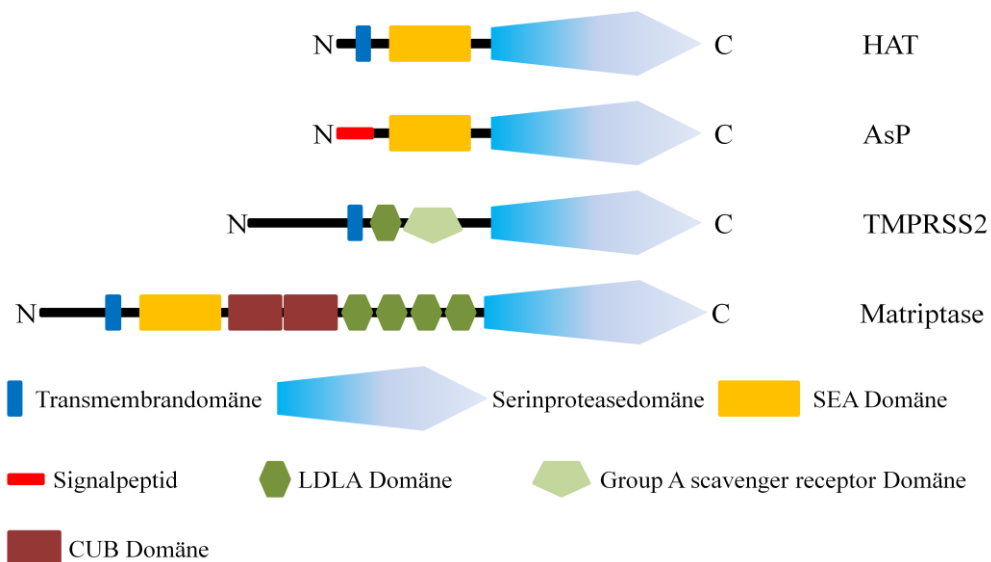


Abbildung 4.1 Domänenstruktur ausgewählter Transmembranserinproteasen vom Typ II. Dargestellt ist der schematische Aufbau der HAT, der homologen Protease AsP aus Ratten, der TMPRSS2 und der Matriptase. Darstellung modifiziert nach Szabo (Szabo and Bugge, 2008).

⁵ Die Angaben in Klammern entsprechen der Chymotrypsinogennummerierung.

Alle Vertreter aus den vier Subfamilien werden als Zymogene synthetisiert, die durch enzymatische Spaltung nach einem spezifischen Arginin oder Lysin aktiviert werden. Für HAT, wie auch für Matriptase, Hepsin und TMPRSS2 bis 4 wurde eine autokatalytische Aktivierung beschrieben (Szabo and Bugge, 2008; Böttcher-Friebertshäuser et al., 2010). Nach erfolgter Aktivierung bleiben die C-terminalen Proteasedomänen über eine Disulfidbrücke mit den N-terminalen Transmembrandomänen kovalent verbunden, so dass sie ihre Aktivität in Zellkompartimenten oder auf der Zelloberfläche entfalten.

In der HAT/DESC-Familie, in Matriptase 1 bis 3 und der Enteropeptidase wurde außerdem eine sogenannte SEA-Domäne identifiziert. SEA ist die Abkürzung für *Sea urchin sperm protein, Enteropeptidase and Agrin*, den ersten Proteinen, in denen diese Domäne gefunden wurde (Bork and Patthy, 1995). Die Funktion dieses Bereichs ist zurzeit noch unbekannt, allerdings gibt es Hinweise, dass die SEA-Domänen in Zusammenhang mit Glykosilierungsreaktionen stehen. Von Matriptase und Enteropeptidase ist bekannt, dass in dieser Region eine autokatalytische Spaltung erfolgt, die Voraussetzung für die Aktivierung der Protease ist. Die bekannten, nicht membrangebundenen Formen der HAT (vgl. Abschnitt 4.1.1), Matriptase, TMPRSS2 und Enteropeptidase werden möglicherweise über eine zweite Spaltung innerhalb der SEA-Region von der Oberfläche der Zellen freigesetzt. Durch dieses sogenannte *shedding* entstehen lösliche Formen dieser Proteasen. Allerdings sind die genauen Mechanismen bisher noch nicht vollständig aufgeklärt (Levitin et al., 2005; List et al., 2006; Bugge et al., 2009).

Neben der SEA-Domäne konnten noch weitere charakteristische Abschnitte in den anderen Proteasen identifiziert werden. Deren Bedeutung ist noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

Viele Transmembranserproteasen vom Typ II zeigen relativ strikte Expressionsmuster. Während HAT hauptsächlich in der Trachea lokalisiert ist (vgl. Abschnitt 4.1.3), werden z. B. Corin nur im Herz, Hepsin in der fetalen Leber und Niere und Enteropeptidase im Intestinaltrakt exprimiert. Eine Ausnahme ist Matriptase, die zunächst in humanen Brustkrebszelllinien identifiziert wurde. Sie hat von allen Proteasen aus dieser Klasse das breiteste Expressionsmuster und wird ubiquitär exprimiert; für einen Überblick über die Expressionsmuster dieser Proteasen sei auf die Artikel von Antalis und Szabo verwiesen (Szabo et al., 2003; Antalis et al., 2011).

Physiologische Funktionen dieser Proteasen sind Gegenstand zahlreicher Studien und in verschiedenen Übersichtsartikeln zusammengefasst (Szabo and Bugge, 2008; Antalis et al., 2011). Für die Proteasen aus der HAT/DESC-Subfamilie konnten allerdings bisher *in-vivo* keine physiologischen Funktionen nachgewiesen werden (Kyrieleis et al., 2007). Pathophysiologisch scheinen verschiedene Mitglieder der TTSP-II-Klasse mit der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren eng verknüpft zu sein, worauf die erhöhte Expression von u. a. Matriptase, Hepsin und TMPRSS2 in einigen Tumorgeweben hindeutet. Hepsin ist an der Entstehung vieler Prostatakarzinome beteiligt und eine Überexpression von Hepsin in den Tumoren ist Anlass für eine ungünstige klinische Prognose. Matriptase ist möglicherweise an der Entstehung einer Vielzahl verschiedener Tumore beteiligt (Uhland, 2006), während TMPRSS2 oft in Tumoren der Prostata gefunden wurde. Andere Typ-II-Transmembranserinproteasen konnten bisher nicht eindeutig mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden.

4.1.3 Lokalisation der HAT

Wie beschrieben wurde die lösliche Form der HAT im Sputum von Patienten mit chronischen Atemwegserkrankungen erstmals entdeckt. HAT wurde jedoch auch im Tracheagewebe gesunder, nicht chronisch erkrankter Patienten nachgewiesen (Yamaoka et al., 1998).

Ihre Expression ist allerdings nicht auf Atemwegsgewebe beschränkt. Mittels quantitativer PCR konnte HAT-spezifische mRNA in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, vor allem im oberen Gastrointestinaltrakt in Zunge und Ösophagus. Geringere Mengen wurden auch in Blase, Prostata, Hoden und Rückenmark nachgewiesen; das Ausmaß der Expression erreicht jedoch nicht jenes von Tracheagewebe. In Herz, Plazenta, Leber und Nebenniere konnte keine mRNA der HAT gefunden werden. Zu berücksichtigen ist, dass der Nachweis von mRNA nicht mit proteolytischer Aktivität der Protease gleichzusetzen ist, da nicht jede mRNA in der Zelle translatiert wird.

In bronchialen, zilientragenden Epithelzellen der Trachea ist es gelungen, HAT mittels spezifischen Antikörpern immunhistochemisch anzufärben (Abbildung 4.2). Die Protease konnte in und auf der Oberfläche der Epithelzellen detektiert werden, dagegen wurde die Protease nicht in Mastzellen und serösen Drüsen unterhalb der Schleimhaut gefunden. Auf subzellulärer Ebene wurden Bereiche im rauen endoplasmatischen Retikulum

und im Golgi-Apparat angefärbt. Außerdem wurde HAT auf der luminalen Seite der Zilienzellen und somit die membranverankerte Form der Protease nachgewiesen (Takahashi et al., 2001).

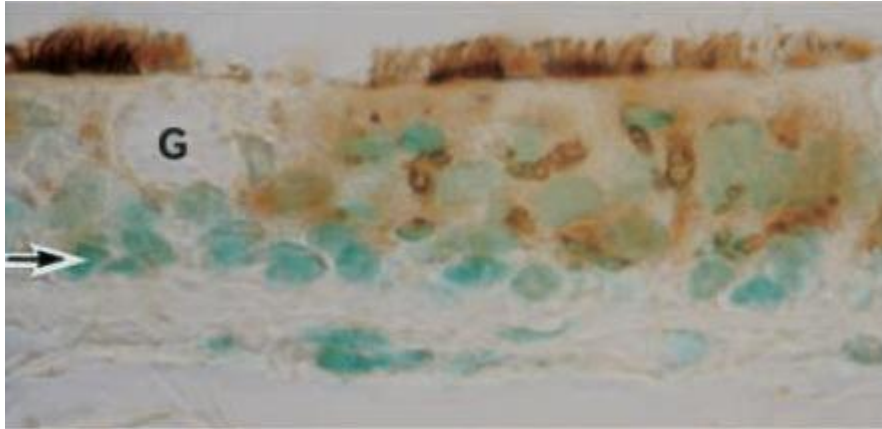


Abbildung 4.2 Histologischer Nachweis der HAT im Tracheagewebe. Das Präparat aus Bronchialgewebe wurde mit einem HAT-spezifischen Antikörper inkubiert und mit der Avidin-Biotin-Peroxidasemethode angefärbt. Der positive Nachweis der HAT ist durch braune Färbung in und auf den ziliären Zellen erkennbar. In den serösen Drüsen (G) und Zellen der Basalschicht (Pfeil) ist HAT nicht nachweisbar. Abbildung übernommen aus (Takahashi et al., 2001).

4.1.4 Physiologie und Pathophysiologie

Die physiologischen Funktionen der HAT sind zurzeit nicht bekannt. Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Trypsin Influenzähämagglutinin aktivieren kann. Da Trypsin aber nicht in den Atemwegen exprimiert wird, muss die Aktivierung durch eine andere Protease erfolgen. So konnte 2006 bewiesen werden, dass HAT den Hämagglutininprecursor saisonaler Influenzaviren prinzipiell spalten kann (Böttcher et al., 2006). Diese Untersuchungen werden in Abschnitt 4.5 ausführlicher beschrieben.

Eine Reihe weiterer Studien weisen auf die Beteiligung der HAT am Entzündungs geschehen und der Entwicklung von bronchialem Asthma hin (Szabo and Bugge, 2008). Die Proliferation bronchialer Fibroblasten wird möglicherweise über HAT-induzierte Aktivierung des protease-aktivierbaren Rezeptors 2 (PAR-2) vermittelt (Matsushima et al., 2006). Bronchiale Fibroblasten sind an der Reparatur und Regeneration von Lungengewebe, aber auch an der Ausbildung von fibrotischem Gewebe beteiligt. PAR-2 ist ein *single-use* Rezeptor, der bei Gewebeverletzungen in der Lunge auch von weiteren trypsinartigen Serinproteasen aktiviert werden kann (Coughlin, 2005). Die vermehrte Produktion von Schleim in den Atemwegen wird von der HAT über eine Aktivierung

des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) vermittelt. Eine vermehrte Schleimproduktion ist neben Anzeichen einer Entzündung oft Symptom von chronischen Atemwegserkrankungen (Chokki et al., 2004; Chokki et al., 2005).

Auch im Hautgewebe von Patienten mit Schuppenflechte konnte HAT nachgewiesen werden. Ihre Beteiligung am Krankheitsgeschehen besteht möglicherweise in der Freisetzung des inflammatorischen Zytokins Interleukin-8, die ebenfalls über PAR-2 vermittelt wird (Iwakiri et al., 2004).

4.2 Homologiemodell der HAT

Bisher ist noch keine Kristallstruktur der HAT bekannt. Deshalb wurde für die bekannte Aminosäuresequenz der Proteasedomäne der HAT ein Homologiemodell mit der 2007 gelösten Kristallstruktur der DESC-1 (2OQ5.pdb) als Template erstellt (Kyrieleis et al., 2007). Die Aminosäuresequenz der DESC-1 weist eine Sequenzidentität von 50,4 % zur HAT auf. Für das Homologiemodelling wurde der Swiss-Model-Server verwendet und das berechnete Modell anschließend mit der Software MOE energieminiert (Guex and Peitsch, 1997; Schwede et al., 2003; Arnold et al., 2006). In Abbildung 4.3 ist das berechnete Modell der Proteasedomäne der HAT, überlagert mit dem Inhibitor Bzls-D-Ser-Ser-AMBA aus einer Kristallstruktur mit Urokinase (1VJA.pdb), dargestellt. Die für die einzelnen Subtaschen charakteristischen Aminosäuren und die Aminosäuren der katalytischen Triade (Ser195, Asp102 und His57) sind in der unteren Abbildung als Stabmodell dargestellt, alle anderen Aminosäuren wurden zur besseren Übersicht ausgeblendet.

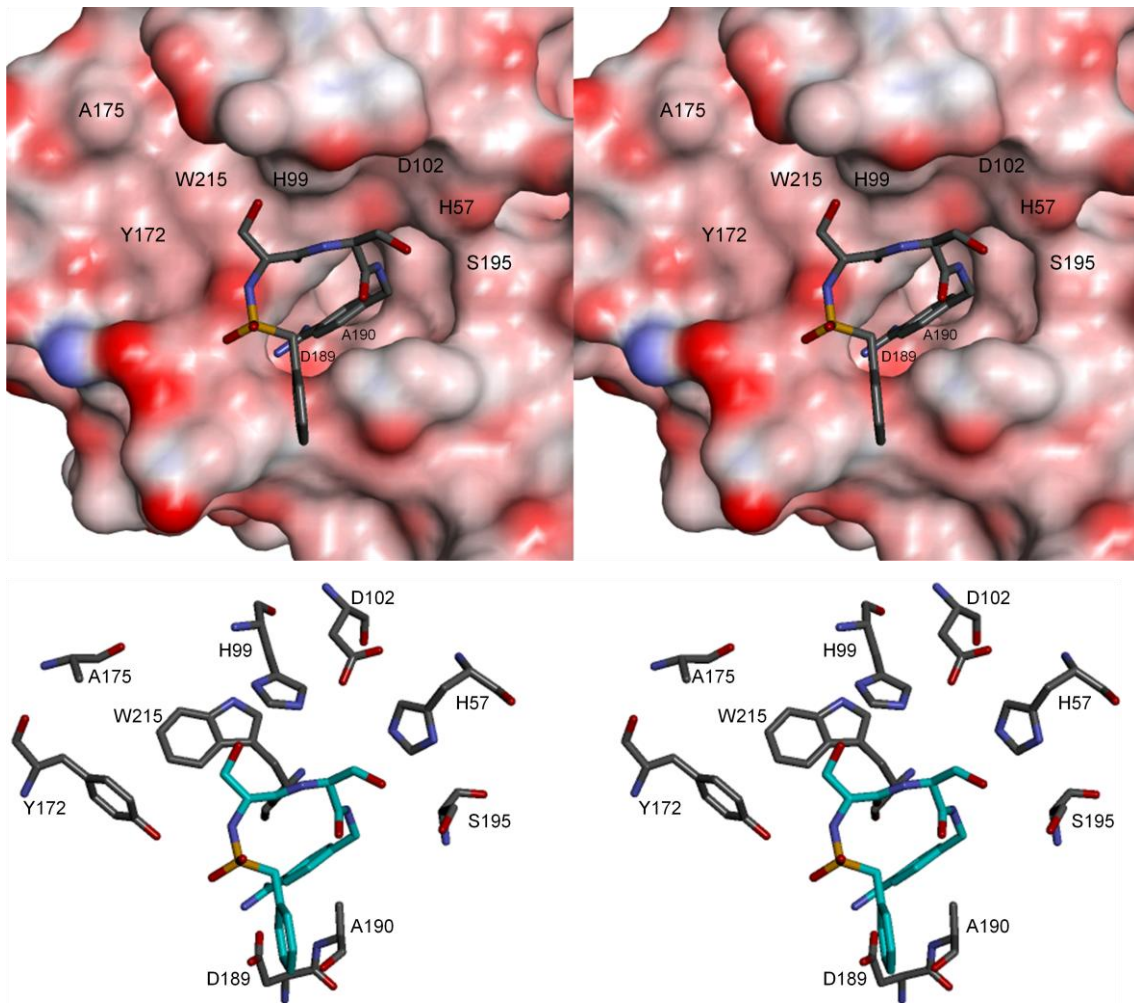


Abbildung 4.3 Stereobild des Homologiemodells der HAT überlagert mit dem Inhibitor Bzls-D-Ser-Ser-AMBA aus der Kristallstruktur im Komplex mit Urokinase (1VJA.pdb). Die Farbe der Oberfläche des Enzyms in der oberen Abbildung entspricht dem berechneten negativen (10 kT/e, rot) und positiven (-15 kT/e, blau) elektrostatischen Potential.

Die Darstellung zeigt die für trypsinartige Serinproteasen charakteristische tiefe S1-Tasche in der Mitte der Darstellung mit der am Boden befindlichen Seitenkette des Asp189. Dieser Aminosäurerest bestimmt die hohe Affinität zu Substraten mit einer basischen Aminosäure in P1-Position und interagiert mit dem Amidinobenzylamidrest des Inhibitors. Sämtliche Aminosäurereste, die die S1-Tasche definieren, sind in Abbildung 4.4 als Stereobild dargestellt. Über der proximalen S2-Tasche befindet sich ein Histidinrest in Position 99, der z. B. auch in Urokinase, Matriptase 2 und Spinesin zu finden ist. Die östliche Seite der S2-Tasche wird durch His57 aus der katalytischen Triade begrenzt. Tyr172, Trp215 und Ala175 definieren die distale hydrophobe S3/S4-Tasche. Diese Tasche ist im Gegensatz zu anderen trypsinartigen Serinproteasen weniger charakteristisch ausgeprägt, da das Tyr172 in dem Homologiemodell unterhalb

des Trp215 positioniert ist, wodurch sich eine in westlicher Richtung flach abfallende distale Bindetasche ergibt.

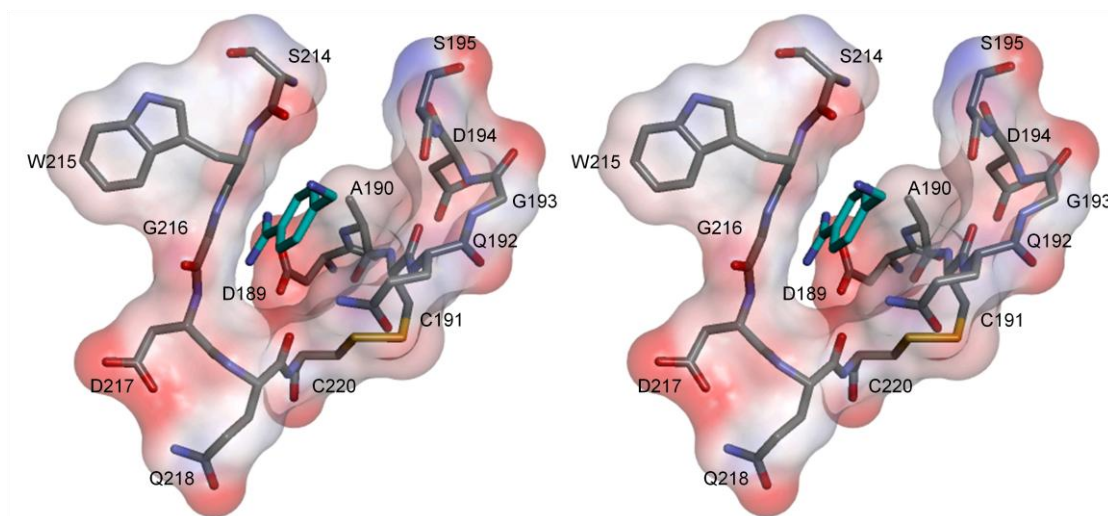


Abbildung 4.4 Stereobild der S1-Tasche der HAT. In Türkis ist nur der Amidinobenzylaminrest des überlagerten Inhibitors aus Abbildung 4.3 dargestellt.

4.3 Substrate

Die lösliche Form der HAT wurde erstmals durch Spaltung des Trypsinsubstrats Boc-Phe-Ser-Arg-AMC identifiziert (Yasuoka et al., 1997). Im Rahmen einer ersten Charakterisierung der damals unbekannten Protease wurde eine Reihe von potentiellen AMC-Substraten untersucht. Die Experimente wurden mit einer konstanten Substratkonzentration durchgeführt und nach einer Reaktionsdauer von 60 Minuten durch Zugabe von Essigsäure beendet. Die Konzentration an freiem AMC wurde fluorometrisch bestimmt und das Ausmaß der Spaltung der einzelnen Substrate prozentual im Vergleich zu dem Trypsinsubstrat Boc-Phe-Ser-Arg-AMC (= 100 %) angegeben. Von den untersuchten Substraten wurden solche mit einem Arginin in P1-Position am schnellsten gespalten, Substrate mit Lysin in P1-Position hingegen zeigten wesentlich geringere Aktivität, z. B. 3 % bei Boc-Glu-Lys-Lys-AMC. Andere Aminosäuren wie Pro, Ala oder Phe in P1-Position wurden nicht akzeptiert, so dass weder das Chymotrypsinsubstrat Succinoyl-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC noch das Elastasesubstrat Succinoyl-Ala-Pro-Ala-AMC gespalten wurden. Neben der Referenz wurden mit den Peptiden Boc-Val-Pro-Arg-AMC (79 %), Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (48 %) und Boc-Glu-Arg-Arg-AMC (38 %) die größten Spaltraten erzielt (Yasuoka et al., 1997).

In einer weiteren Arbeit wurde eine Serie von FRET-Substraten untersucht (Wysocka et al., 2010). Dabei wurde eine Tetrapeptidbibliothek synthetisiert, bei der in den Positionen P4 bis P2 alle natürlichen Aminosäuren (mit Ausnahme von Cystein) nach der *Split-and-mix*-Methode eingebaut wurden. Alle Substrate wurden N-terminal mit einer 2-Aminobenzoesäuregruppe (ABZ) als Fluoreszenzdonor acyliert und C-terminal mit einem 5-Amino-2-Nitrobenzoesäureamid (ANB-NH₂) als *quencher* modifiziert, so dass ihre Spaltung fluorometrisch messbar war. Als P1-Reste wurden Arg und Lys verwendet, wobei die Derivate mit P1-Arg besser gespalten wurden als die entsprechenden P1-Lys Verbindungen.

Das Substrat mit dem größten k_{cat} -Wert und dem günstigsten Verhältnis von k_{cat} - zu K_{m} -Wert ist das Peptid ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-ANB-NH₂ (Abbildung 4.5) mit $k_{\text{cat}} = 11,52 \text{ s}^{-1}$ und einem k_{cat} zu K_{m} -Verhältnis von $454,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Im Vergleich dazu wird das unspezifische Trypsinsubstrat Boc-Phe-Ser-Arg-AMC wesentlich langsamer gespalten ($k_{\text{cat}} = 2,54 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 58,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

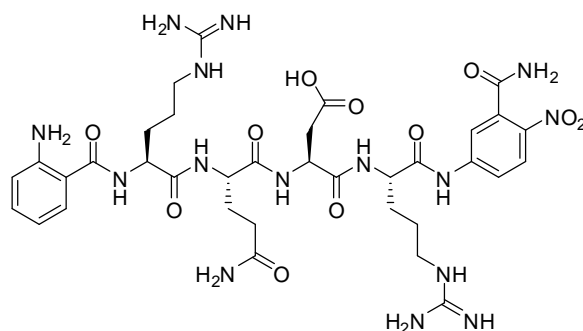


Abbildung 4.5 Struktur des FRET-Substrates ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-ANB-NH₂ (Wysocka et al., 2010).

In dieser Untersuchung wurde festgestellt, dass HAT in P4-Position ein Arg bevorzugt, jedoch auch Tyr, Val und Phe akzeptiert werden. In P3-Position ist Gln besonders gut geeignet, Trp und Pro sind ungeeignet. Zusammen mit Enteropeptidase ist HAT die einzige bekannte trypsinartige Serinprotease, die eine Präferenz für Asp als P2-Rest hat. Der Einbau von Glu, Arg oder Lys führte hier hingegen zu einer langsameren Substratspaltung (Wysocka et al., 2010).

Für Matriptase 1 und 2, Hepsin und DESC 1 wurde ein homologes Substrat mit der Sequenz Boc-Arg-Gln-Ala-Arg-AMC identifiziert. Dies weist auf ähnliche Anforderungen der genannten Proteasen und der HAT an ihre Substrate hin. Wird das P2-Ala durch

Asp ersetzt, erhöht sich die Selektivität als HAT-Substrat, so dass es von anderen Proteasen weniger schnell gespalten wird (Beliveau et al., 2009).

4.4 Inhibitoren

Bisher sind nur wenige Inhibitoren der HAT bekannt. Von Yasuoka wurden im Zuge der Identifizierung der HAT erste Untersuchungen über die Hemmung der damals neuen Protease durchgeführt (Yasuoka et al., 1997). Verschiedene bekannte Proteaseinhibitoren wurden in einer fixen Konzentration von 10 μ M verwendet und prozentuale Hemmraten bestimmt. Einige der niedermolekularen Inhibitoren sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

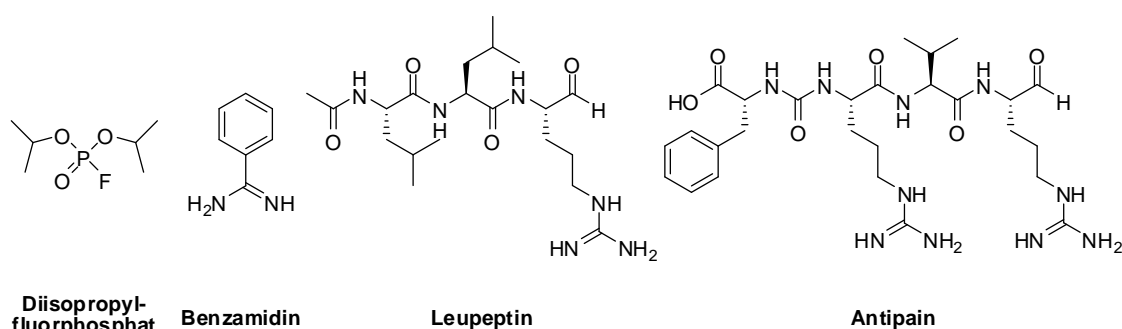


Abbildung 4.6 Strukturen unspezifischer niedermolekularer Serinproteaseinhibitoren (Yasuoka et al., 1997).

Diisopropylfluorophosphat, ein irreversibler Inhibitor von zahlreichen Serinproteasen, inhibiert HAT vollständig. Der ehemals als Arzneistoff zugelassene Plasmininhibitor Aprotinin (Trasylo[®]) ist ein 58 Aminosäuren umfassender Kunitz-Typ-Inhibitor und zeigt, ebenso wie Benzamidin, eine Hemmung von nahezu 100 %. Trasylo wurde 2008 aufgrund lebensbedrohlicher Nebenwirkungen vom Markt zurückgezogen. Benzamidin ist ein Standardinhibitor trypsinartiger Serinproteasen und wird häufig für Kristallisationsversuche verwendet. Eine Hemmwirkung im Bereich von 94 bis 97 % wurde mit den Trypsininhibitoren Leupeptin, Antipain und dem Sojabohnen-Trypsininhibitor erzielt, wohingegen Inhibitoren der Elastase keine Wirkung zeigen. Auch Ethylendiaminotetraessigsäure, ein starker Komplexbildner für zweiwertige Kationen, hemmt HAT nicht. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Protease keine zweiwertigen Metallionen für ihre Aktivität benötigt.

Neben dem initialen Inhibitorscreening wurden von den identifizierten Substraten (vgl. Abschnitt 4.3) Inhibitoren mit einer C-terminalen Aldehydfunktion abgeleitet (Wysocka et al., 2010). Die Derivate ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-H und ABZ-Arg-Gln-Asp-Lys-H hemmen HAT mit K_i -Werten von 54,3 nM bzw. 112,3 nM (Abbildung 4.7). Jedoch sind substratanaloge Inhibitoren mit Aldehydfunktion aufgrund von Instabilität und geringer Selektivität für eine Arzneistoffentwicklung wenig geeignet.

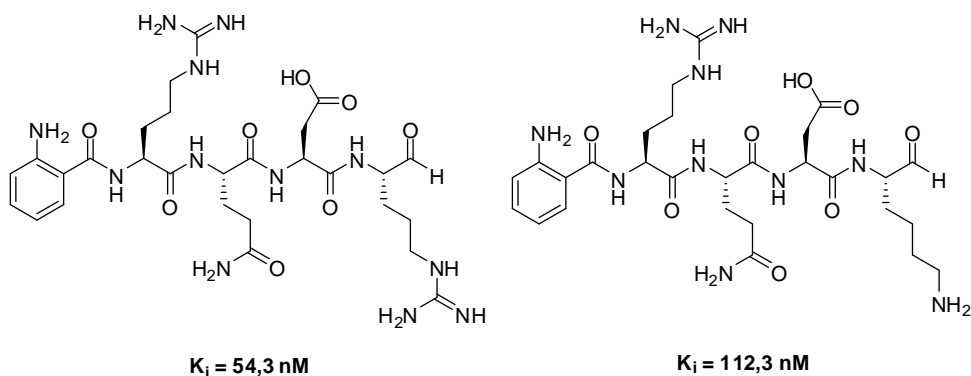


Abbildung 4.7 Strukturen substratanaloger Inhibitoren mit C-terminaler Aldehydfunktion.

4.5 HAT und TMPRSS2 aktivieren Influenza-A-Viren

Am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg, in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Garten, wurden 2006 zwei Proteasen, HAT und TMPRSS2, identifiziert, die in den humanen Atemwegen das Vorläufermolekül HA0 des Hämagglutinins (HA) spalten und dadurch eine Vermehrung der Influenzaviren ermöglichen. Hierzu wurden in humanen Lungenkarzinomzellen, die selbst keine HA-spaltenden Proteasen exprimieren, die Protease HAT bzw. TMPRSS2 und der Hämagglutininprecursor HA0 koexprimiert. Erst dadurch wurden die HA0-Spaltprodukte HA1 und HA2 erhalten. Dies ist ein deutlicher Hinweis für die Beteiligung dieser Proteasen an der Vermehrung von Influenzaviren (Böttcher et al., 2006). Wurde durch gerichtete Mutation das katalytisch wirksame Ser195 in der HAT gegen ein Alanin ausgetauscht, entstanden keine Spaltprodukte des HA0. So wurde bewiesen, dass in diesen Zellen tatsächlich die entsprechende Protease das HA0 spaltet.

In späteren Experimenten mit MDCK-Zellen (*Madin Darby canine kidney*-Zellen) wurde eine multizyklische Vermehrung von Influenzaviren der Subtypen H1, H2 und H3 nachgewiesen, sofern die Zellen mit HAT- bzw. TMPRSS2-codierenden Plasmiden transfiziert wurden (Böttcher et al., 2006). In der linken bzw. der mittleren Spalte von

Abbildung 4.8 ist die Virusausbreitung durch die kometenartigen, mit Antikörpern angefärbten infizierten Zellen dargestellt. Wurden die Zellen mit der katalytisch nicht aktiven TMPRSS2(S441A)-Mutante transfiziert, können sich die Viren hingegen nur einmal in den Zellen vermehren, da das Hämagglutinin der nächsten Virusgeneration nicht aktiviert werden konnte. Es resultierten einzelne infizierte Zellen, die in der rechten Spalte von Abbildung 4.8 nur als schwache schwarze Punkte erkennbar sind. So wurde der Nachweis erbracht, dass HAT und TMPRSS2 in Zellkulturen die multizyklische Vermehrung von Influenzaviren ermöglichen.

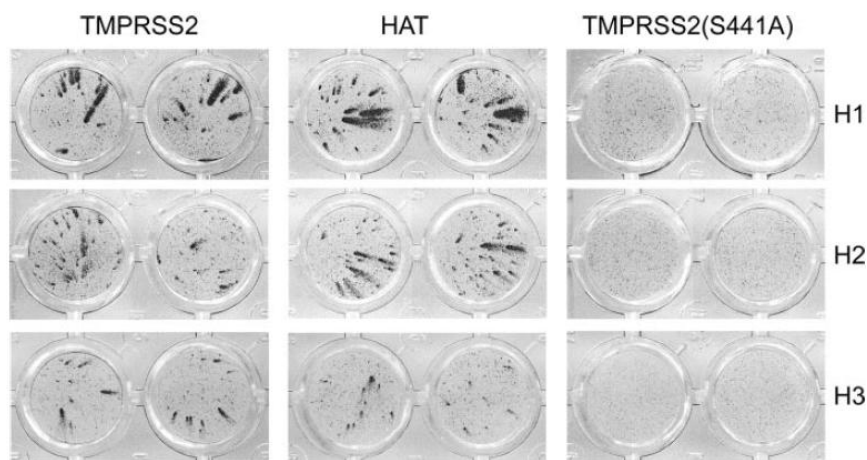


Abbildung 4.8 Multizyklische Replikation von Influenzaviren in MDCK-Zellen transfiziert mit TMPRSS2 (Links), HAT (Mitte) und der inaktiven TMPRSS2(S441A) (Rechts). Verwendet wurden die Influenzaviren A/Memphis/14/96 (H1N1), A/Mallard/Alberta/205/98 (H2N9) und A/Texas/6/96 (H3N2) bei einer *multiplicity of infection* von 0.01. Einen Tag nach erfolgter Infektion wurde das virale Nukleoprotein immunohistochemisch angefärbt. Abbildung übernommen aus (Böttcher et al., 2006).

Um den Einfluss von Hemmstoffen der HAT oder TMPRSS2 auf die Virusvermehrung zu untersuchen, wurde ein auf MDCK-Zellen basierendes Testsystem mit durch Doxycyclin induzierbarer Expression von HAT bzw. TMPRSS2 etabliert. Eine Dauerexpression in den Zellen war nicht realisierbar, da die hohe Proteasekonzentration toxische Effekte auf die Zellen besitzt. Mit diesen induzierbaren Testsystemen konnte erstmals die Hemmung der Virusausbreitung durch benzamidinhaltige, substratanaloge Inhibitoren aus unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Böttcher et al., 2009). In weiteren Experimenten wurde festgestellt, dass nur die membrangebundene Form der HAT auf der Oberfläche von Zellen das Hämagglutinin aktiviert und nicht die lösliche Form, die durch Abspaltung in der SEA-Domäne entsteht. Die TMPRSS2 hingegen entfaltet ihre Aktivität hauptsächlich innerhalb der Zellen (Böttcher-Friebertshäuser et al., 2010).

5 Entwicklung und Synthese der HAT-Inhibitoren

In diesem Kapitel werden die Arbeiten zur Entwicklung von HAT-Inhibitoren beschrieben. Zu Beginn wurde ein Test zur enzymkinetischen Charakterisierung der Inhibitoren etabliert (Abschnitt 5.1). Mit diesem Test wurde ein erstes *screening* von in unserem Arbeitskreis verfügbaren potentiellen HAT-Inhibitoren durchgeführt (Abschnitt 5.2). In den Abschnitten 5.3 und 5.4 werden die Synthesen der substratanalog Inhibitoren und der Inhibitoren des TAPAP-Typs erläutert. Die Bestimmung der K_i -Werte und die Diskussion der Ergebnisse erfolgen in den Abschnitten 5.5 und 5.6, die Untersuchung der Selektivität der Inhibitoren in Abschnitt 5.7. Die Versuche zur Hemmung der Ausbreitung von Inflenzaviren in Zellkultur durch ausgewählte Inhibitoren werden in Abschnitt 5.8 dargestellt.

5.1 Entwicklung eines Tests zur Bestimmung der HAT-Aktivität

Zu Beginn der Arbeiten musste ein enzymkinetischer Test zur Bestimmung der Hemmkonstanten für HAT etabliert werden. Die von R&D Systems (Wiesbaden) bezogene lyophilisierte Protease wurde, wie vom Hersteller beschrieben, in 25 mM Tris-Puffer pH 7,5 mit 150 mM NaCl rekonstituiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Zunächst konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden, da die Aktivität der rekonstituierten Protease im Zeitraum weniger Tage stark abnahm. Zur Stabilisierung der HAT-Struktur wurden dem Rekonstitutionspuffer und dem Messpuffer 0,05 % Brij 58, einem nicht-ionischen Detergens auf Polyethylenglykolbasis, zugesetzt. Der Messpuffer besteht aus 50 mM Tris pH 9,5 mit 0,05 % Brij 58 und 0,1 mg/mL BSA. Der Zusatz von BSA dient dazu, unspezifische Proteinabsorption an Gefäßwänden zu reduzieren. Mit diesen detergenschaltigen Puffern konnten stabile Aktivitäten der Protease erreicht werden. In einer späteren Produktinformation der Herstellerfirma vom 28. März 2011 wird nun die Zugabe von Brij 35 zu den Puffern empfohlen.

Zur Auswahl eines geeigneten Substrates wurden verschiedene Tripeptidderivate mit dem Fluorophor AMC als P1-Rest vermessen. In Abbildung 5.1 sind die Strukturen von drei Substraten dargestellt, deren enzymkinetische Parameter k_{cat} und K_m bestimmt wurden. Der k_{cat} -Wert beschreibt die stöchiometrische Menge an Substrat, die maximal

von einem Enzym mit der Konzentration 1 mol/L in einer Zeiteinheit umgesetzt werden kann. Das Verhältnis von k_{cat} - zu K_{m} -Wert eines Substrates ist ein Maß für die katalytische Effizienz und gibt die Güte eines Substrates für eine Enzymreaktion an. Zur Bestimmung der freien AMC-Konzentration wurde das Fluoreszenzsignal (RFU) durch den Proportionalitätsfaktor 44751 dividiert. Der Proportionalitätsfaktor wurde mit einer AMC-Eichreihe unter identischen Messparametern und einem identischen Messgerät erhalten (Becker, 2011).

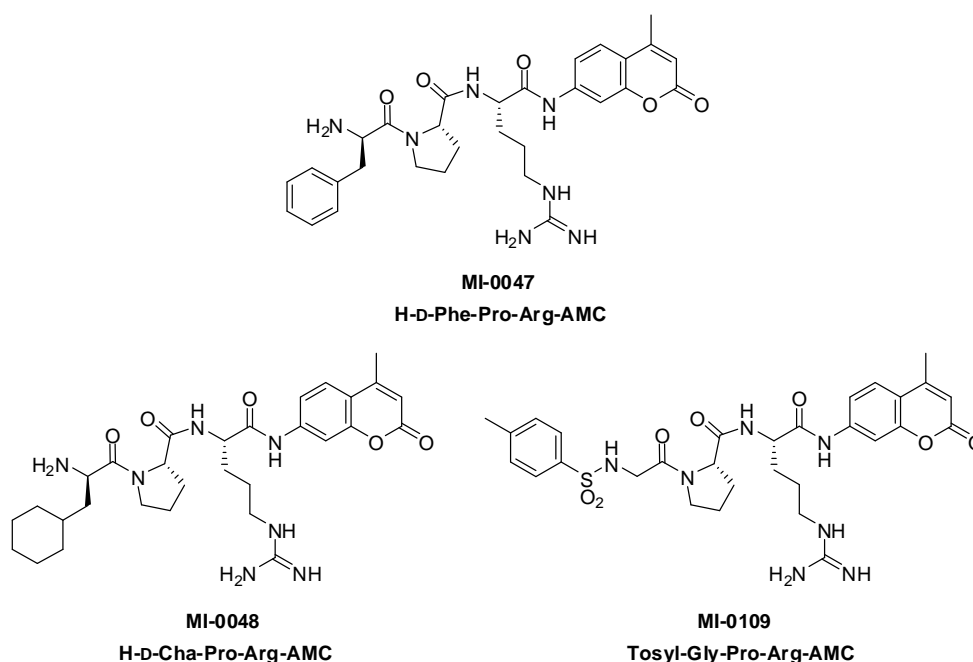


Abbildung 5.1 Strukturformeln fluorogener HAT-Substrate. Alle getesteten Substrate sind als TFA-Salze in unserem Arbeitskreis synthetisiert worden, die Substrate MI-0047 und MI-0109 sind jedoch auch kommerziell erhältlich.

Abbildung 5.2 zeigt die Graphen, die zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter in Tabelle 5.1 verwendet wurden (siehe Seite 83). Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass die ursprünglich als Thrombinsubstrat beschriebene Verbindung MI-0109 das geeignetste HAT-Substrat der drei untersuchten Derivate ist. Da der K_{m} -Wert für HAT deutlich höher ist als der K_{m} -Wert für Thrombin von $16 \mu\text{M}$ ⁶, müssten entsprechend höhere Konzentrationen für die enzymkinetische Testung der Inhibitoren verwendet werden. Mit der verwendeten 10 mM Stammlösung in 50 % DMSO ergaben

⁶ Der K_{m} -Wert des Thrombins für das analoge Substrat Tos-Gly-Pro-Arg-pNA wurde aus der Literatur übernommen (Petrera et al., 2009).

sich jedoch Löslichkeitsprobleme, so dass das Substrat MI-0048 für die standardmäßige Testung von Inhibitoren ausgewählt wurde.

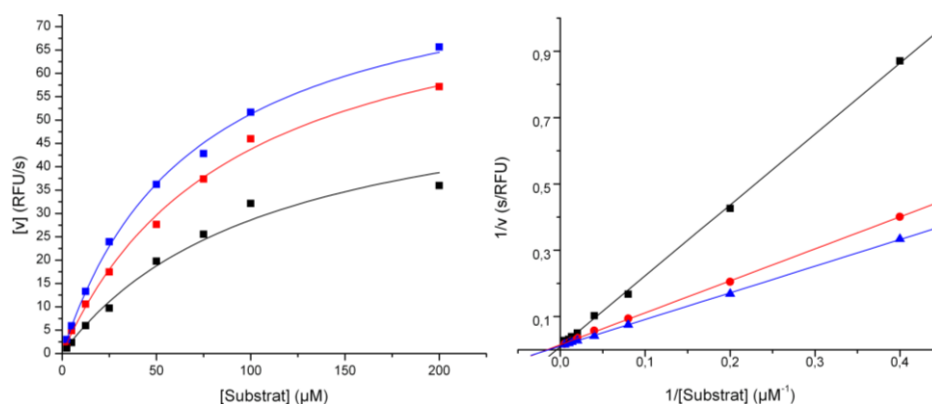


Abbildung 5.2 Michaelis-Menten-Plot (links) für die Substrate MI-0047 (schwarz), MI-0048 (rot) und MI-0109 (blau). Die Werte für V_{max} und K_m wurden zusätzlich mit der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver und Burk (rechts) ermittelt.

Dieses Substrat hat einen leicht geringeren k_{cat}/K_m -Wert, ist aber bei höheren Konzentrationen oberhalb des K_m -Wertes besser löslich. Aus der 10 mM Stammlösung wurden Verdünnungen mit den Konzentrationen 2 mM, 1 mM und 0,5 mM hergestellt und zur Bestimmung der K_i -Werte verwendet. In den Messansätzen wurden die Substratlösungen 1:10 verdünnt, so dass sich ein DMSO-Gehalt von $\leq 1\%$ in den Messansätzen ergab.

Tabelle 5.1 Zusammenstellung der enzymkinetischen Parameter der drei untersuchten Substrate. Zur Berechnung von k_{cat} wurde eine Enzymkonzentration von 23,8 pM, basierend auf den Angaben des Herstellers, zugrunde gelegt. Für V_{max} und K_m wurden die Werte, die aus der Auftragung nach Lineweaver und Burk bestimmt wurden, verwendet.

MI-	V_{max} ($\mu M/s$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
0047	$2,40 \times 10^{-3}$	230	101,17	439800
0048	$1,5 \times 10^{-3}$	64,7	63,02	974000
0109	$2,03 \times 10^{-3}$	73,08	85,42	1168000

5.2 Untersuchung verschiedener Inhibitortypen

Bisher wurden nur wenige Inhibitoren der HAT beschrieben (vgl. Abschnitt 4.4). Deshalb wurde ein erstes *screening* von Verbindungen, die im Arbeitskreis verfügbar waren, durchgeführt. Die Inhibitoren wurden im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 100 μM und einer konstanten Substratkonzentration von 100 μM vermessen. Die berechneten Steigungen wurden an Gleichung 1 (siehe Seite 130) angepasst. Bei bekanntem V_{max} , K_m und S konnte so eine Abschätzung des K_i -Wertes erhalten werden.

Die ursprünglich für Furin entwickelten Amidinohydrazon-Inhibitoren zeigen nur eine geringe Affinität für HAT (Abbildung 5.3).

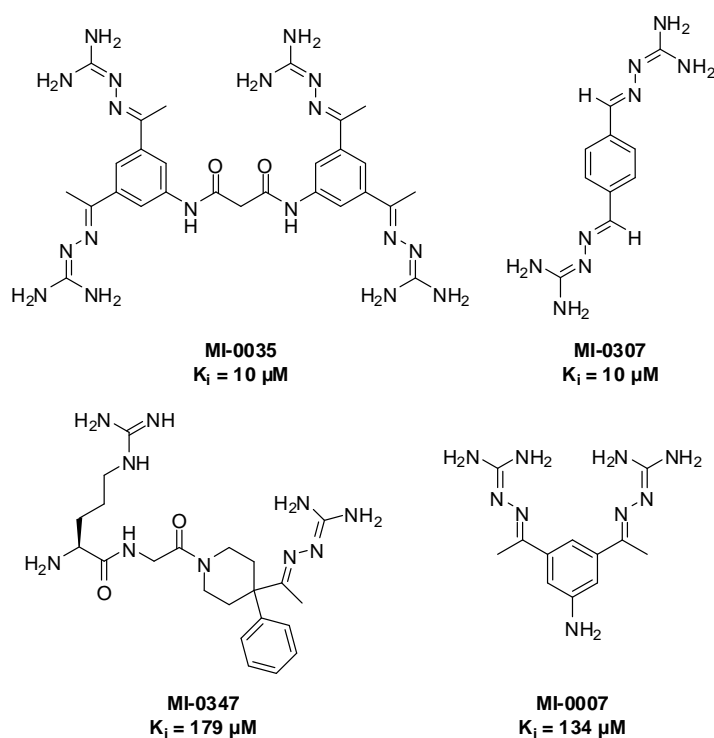


Abbildung 5.3 Strukturformeln untersuchter Amidinohydrazoninhibitoren und K_i -Werte für HAT.

Die dimerisierte Verbindung MI-0035 besitzt mit einer Hemmkonstante von 10 μM die gleiche Wirksamkeit wie das Bis-Amidinohydrazonderivat MI-0307. Die Leitstruktur MI-0007 für die Entwicklung der zuvor beschriebenen Furininhibitoren (MI-0007) und das Phenylpiperidinderivat MI-0347 haben K_i -Werte $> 100 \mu\text{M}$. Wegen ihrer nur geringen Hemmwirkung wurden Amidinohydrazone nicht weiter als Grundstruktur für die Entwicklung von HAT-Inhibitoren berücksichtigt.

Die in Abbildung 5.4 dargestellten Verbindungen wurden in unserem Arbeitskreis ursprünglich zur Hemmung der Matriptase synthetisiert.

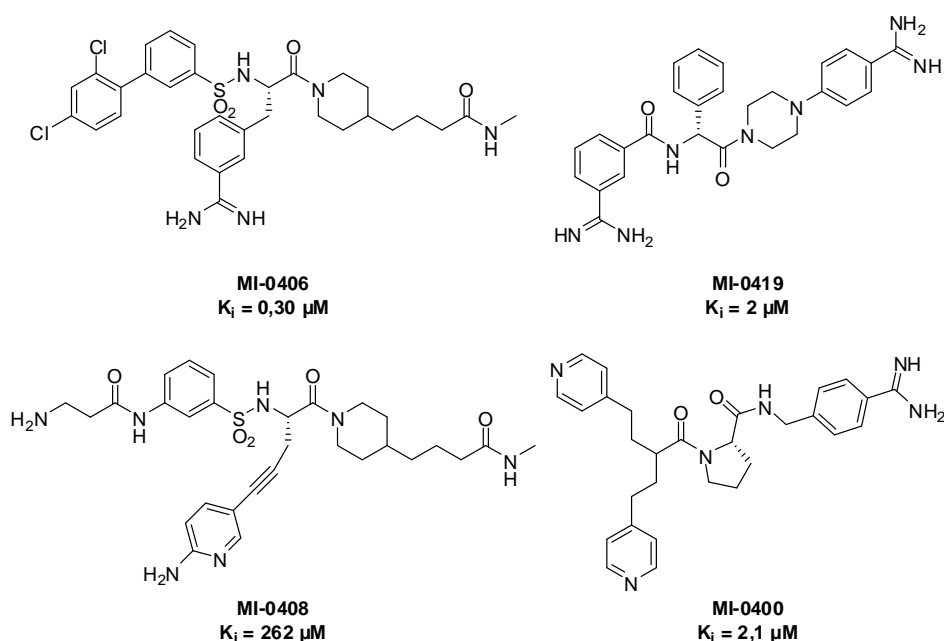


Abbildung 5.4 Strukturformeln untersuchter Matriptaseinhibitoren und K_i -Werte für HAT.⁷

Der Inhibitor MI-0406 mit einem zentralen 3-Amidinophenylalanin leitet sich von dem ursprünglich als Thrombinhemmstoff entwickelten Inhibitor 3-TAPAP (Tosyl-3-Amidinophenylalanin-piperidid) ab (Markwardt et al., 1980), dessen Derivate auch als Hemmstoffe der Urokinase und der Matriptase beschrieben worden sind (Stürzebecher et al., 1999; Steinmetzer et al., 2006). Dieser Inhibitor-typ ermöglicht Modifizierungen am Sulfonylrest und dem sekundären Amid und stellt damit einen möglichen Startpunkt zur Entwicklung von HAT-Hemmstoffen dar. Analoga des Inhibitors MI-0408 wurden ebenfalls als Thrombininhibitoren beschrieben (Berry et al., 2002), sind aber für die Verwendung als Hemmstoffe der HAT wegen ihrer geringen Affinität ungeeignet. Verbindung MI-0416 ist die wirksamste in einer Reihe von getesteten Analoga, die ursprünglich als Hemmstoffe von Faktor Xa beschrieben wurden (Jones et al., 2001; Liebeschuetz et al., 2002). Sie wurde ebenso wie Verbindung MI-0400 aufgrund ihrer geringen Wirksamkeit als HAT-Hemmstoff nicht weiter modifiziert.

⁷ Die Verbindungen wurden in unserem Arbeitskreis von Frau Maya Hammami synthetisiert und freundlicherweise zur Bestimmung der Hemmkonstanten zur Verfügung gestellt.

Lineare, substratanaloge Inhibitoren mit einem C-terminalen 4-Amidinobenzylamid hemmen HAT im niedrigen mikromolaren Bereich und lassen großen Freiraum für Modifikationen in der Aminosäuresequenz (Abbildung 5.5). Das 4-Amidinobenzylamid bindet als Argininmimetikum in die S1-Tasche und interagiert mit der Seitenkette des Asp189. Thrombin, FXa, FVIIa und Urokinase werden durch Verbindungen mit einem Benzamidinrest in P1-Position wirksam gehemmt (Künzel et al., 2002; Gustafsson et al., 2004; Schweinitz et al., 2004; Kadono et al., 2005; Schweinitz et al., 2006; Stürzebecher et al., 2007). Derivate mit diesem P1-Rest wurden in unserem Arbeitskreis auch zur Hemmung des Furins (MI-0227, $K_{i(\text{Furin})} = 0,81 \text{ nM}$) entwickelt (Becker et al., 2010). Verbindung MI-0019 mit einem Amidinopiperidyl-4-methylamid als P1-Rest ist eine homologe Struktur zu dem verwendeten Substrat MI-0048 (vgl. Abbildung 5.1). Dieser P1-Rest ist jedoch weniger geeignet als 4-Amidinobenzylamid und wurde deshalb nicht weiter verwendet. Generell gibt es bei diesem Inhibitortyp viele Möglichkeiten, die Wirksamkeit und Selektivität gegenüber einer Zielprotease zu optimieren.

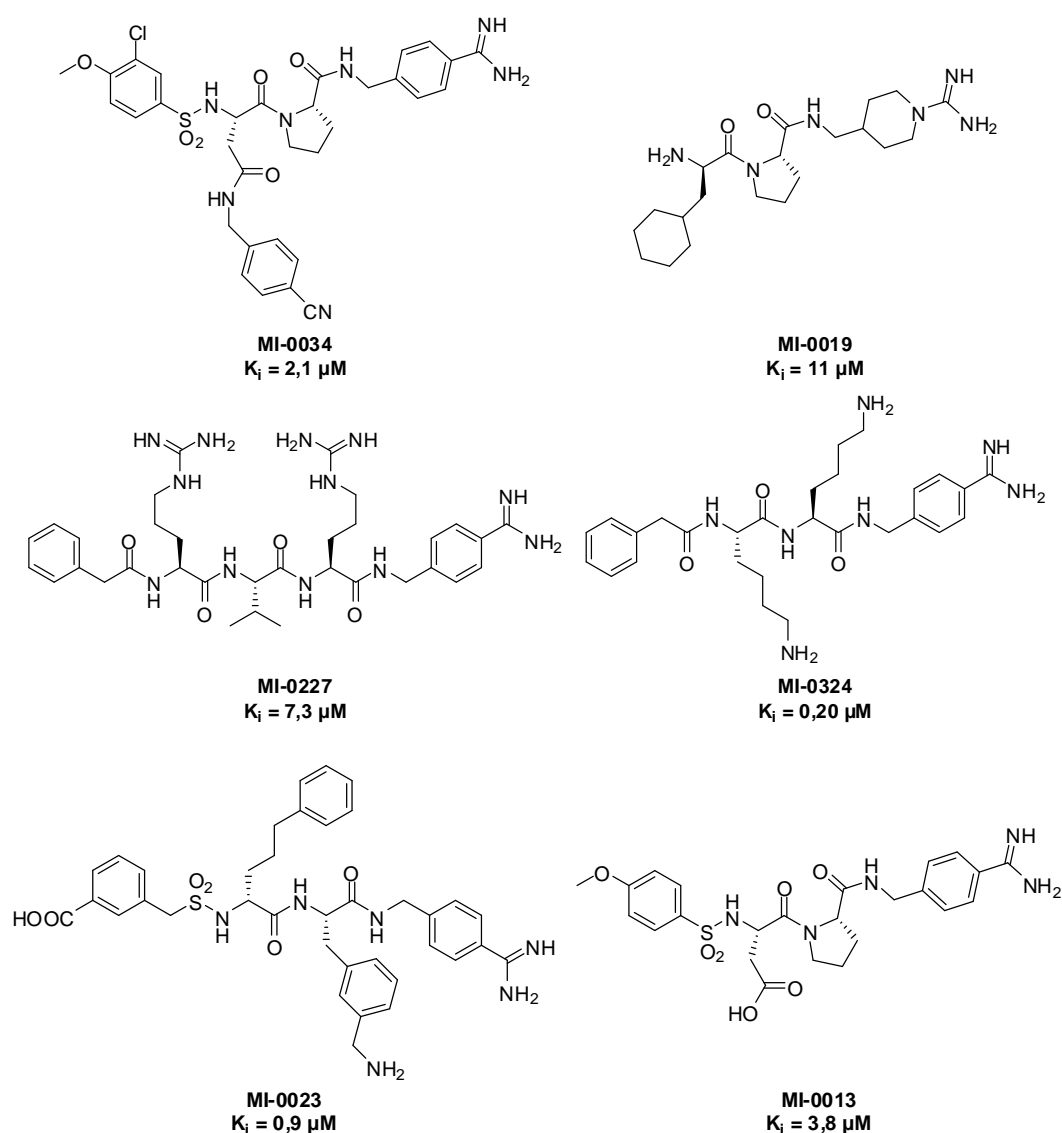


Abbildung 5.5 Strukturformeln untersuchter linearer, substratanaloger Inhibitoren und K_i -Werte für HAT.

Die untersuchten makrozyklischen Verbindungen MI-1020 und MI-0104 (Abbildung 5.6) sind stark wirksame Plasminhemmstoffe mit Hemmkonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich (Saupe and Steinmetzer, 2011). Plasmin fehlt im Gegensatz zu anderen Serinproteasen der sogenannte 99er-Loop (Parry et al., 2000). Der dadurch entstehende freie Raum kann von den Makrozyklen optimal adressiert werden. Dieser Loop ist jedoch bei der HAT vorhanden, wobei sich an Position 99 oberhalb der S2-Tasche ein Histidin befindet. Wegen der lediglich moderaten Hemmung im Vergleich zu Plasmin wurden diese zyklischen Inhibitoren nicht weiter untersucht.

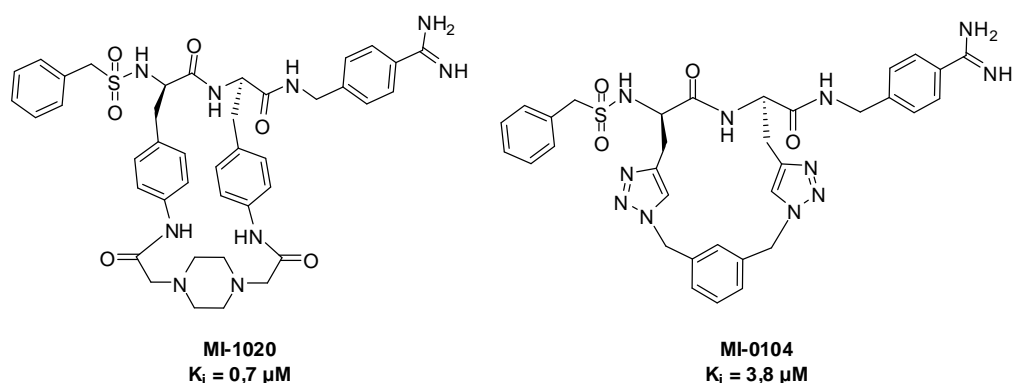


Abbildung 5.6 Strukturformeln untersuchter makrozyklischer Inhibitoren und K_i -Werte für HAT.⁸

Auch die in Abbildung 5.7 dargestellten Verbindungen sind nur wenig geeignete Leitstrukturen für die Synthese neuer HAT-Inhibitoren.

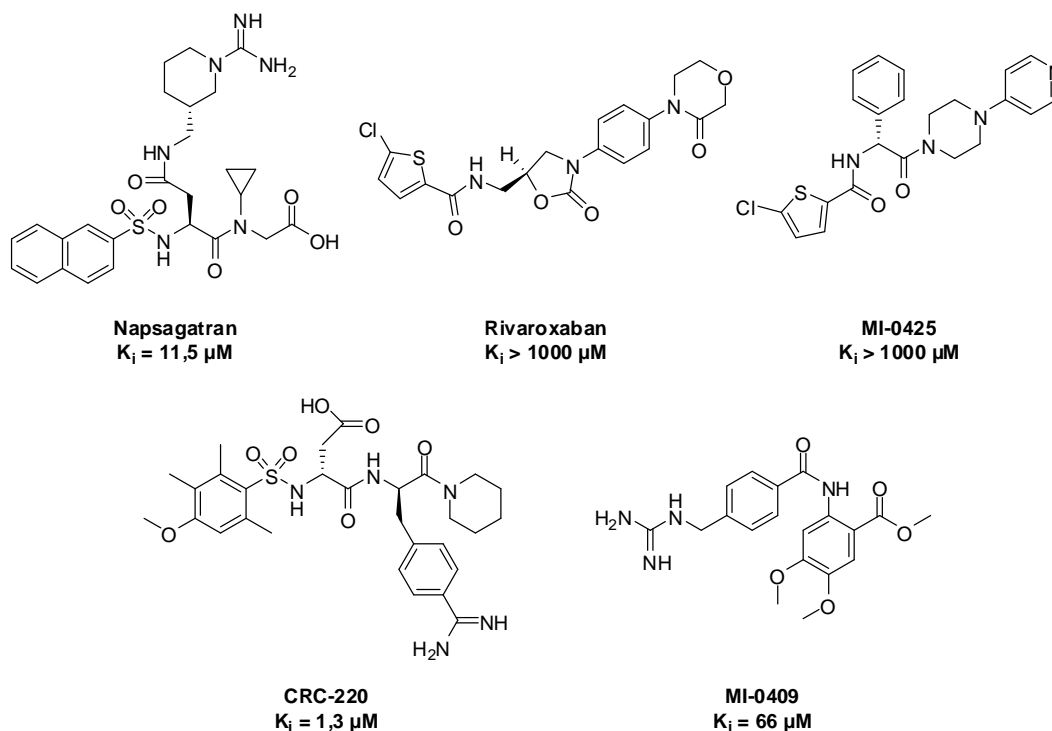


Abbildung 5.7 Strukturformeln weiterer Inhibitoren und K_i -Werte für HAT.

Napsagatran wurde als selektiver Thrombininhibitor beschrieben, Rivaroxaban hingegen als Faktor Xa Hemmstoff. Die 5-Chlorthiophencarbonsäure aus Rivaroxaban besetzt die S1-Tasche von Faktor Xa; dies ist jedoch offenbar bei der HAT nicht möglich, obwohl sie eine sehr ähnlich aufgebaute S1-Tasche besitzt. Die Verbindung CRC-220

⁸ Diese Hemmstoffe wurden in unserem Arbeitskreis von Sebastian Saupe und Steffanie Leubner synthetisiert und freundlicherweise zur Bestimmung der Hemmkonstanten zur Verfügung gestellt.

wurde ebenfalls als Thrombinhemmstoff beschrieben, jedoch zeigten die verwandten Verbindungen vom 3-TAPAP-Typ in diesem initialen *screening* eine stärkere Hemmwirkung. Deshalb wurde dieser Inhibitortyp, ebenso wie Verbindung MI-0409, nicht weiter modifiziert.

Aus diesem *screening* erschienen die substratanalogen Inhibitoren für eine Weiterentwicklung am geeignetsten; zusätzlich wurden einige Derivate des 3-TAPAP-Typs synthetisiert. Dies ist in den folgenden Abschnitten beschrieben.

5.3 Synthese der substratanalogen Inhibitoren

Für die substratanalogen Inhibitoren mit einer D-konfigurierten Aminosäure in P3-Position wurde das Amidinobenzylamid als P1-Rest beibehalten, das in den vergangenen Jahren in zahlreichen Inhibitoren trypsinartiger Serinproteasen verwendet wurde (Künzel et al., 2002; Schweinitz et al., 2004; Schweinitz et al., 2006; Dönnecke et al., 2007; Stürzebecher et al., 2007; Becker et al., 2010). Aufgrund des decarboxylierten P1-Restes sind die Verbindungen gegen den Abbau durch die eigentliche Zielprotease und durch andere Carboxypeptidasen stabil. Für Thrombin wurde erstmals eine weitere hydrophobe Bindungstasche beschrieben, die mit einem Benzylsulfonylrest adressiert werden konnte (Tucker et al., 1997). Wegen vermuteter struktureller Ähnlichkeiten zwischen Thrombin und HAT wurde der Benzylsulfonylrest ebenfalls in den synthetisierten Inhibitoren verwendet.

5.3.1 Modifizierung der P3-Position

In einer ersten Syntheserie sollte der Einfluss verschiedener D-konfigurierter Aminosäuren in P3-Position untersucht werden, deren Seitenketten in die distale S3/S4-Tasche binden. Basierend auf dem Homologiemodelling wurde festgestellt, dass diese Tasche bei der HAT nicht so charakteristisch wie bei Thrombin oder Faktor Xa ausgebildet ist. Die Aminosäure 174, die bei den beiden anderen Proteasen den linken Rand der Tasche definiert, ist bei der HAT so positioniert, dass die S3/S4-Tasche flach und wenig ausgeprägt ist. In P2-Position wurde Prolin eingebaut, da aus der Entwicklung von Inhibitoren für Thrombin, Faktor Xa und Urokinase (Bajusz et al., 1978; Schweinitz et al., 2004; Schweinitz et al., 2006) bekannt ist, dass Prolin eine geeignete P2-Aminosäure für substratanaloge Inhibitoren verschiedener Proteasen ist. Exemplarisch für diese Se-

rie ist im Folgenden die Synthese des Inhibitors MI-0317 beschrieben. Zur Darstellung dieser Verbindungen wurden das P4-P3- und das P2-P1-Segment getrennt voneinander hergestellt. Diese wurden in einem finalen Reaktionsschritt mittels PyBOP (Frerot et al., 1991) miteinander gekoppelt (Abbildung 5.8).

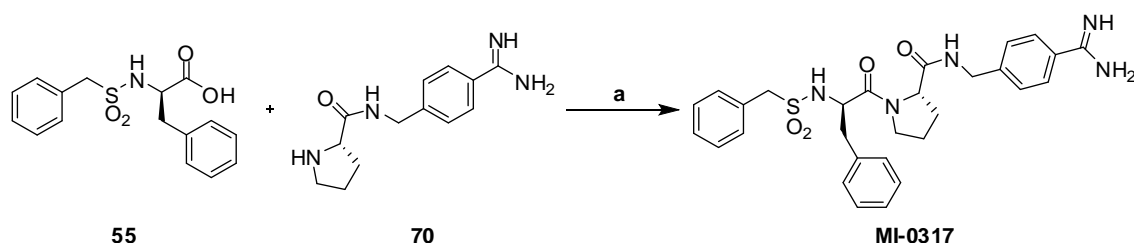


Abbildung 5.8 Synthese des Inhibitors MI-0317 durch Kopplung der zuvor synthetisierten Segmente Bzls-D-Phe-OH (**55**) und H-Pro-4-Amidinobenzylamid \times 2HCl (**70**). **a:** PyBOP, DIPEA in DMF.

Zur Synthese des P2-P1-Segments (Abbildung 5.9) wurde mittels des Mischanhydridverfahrens 4-Cyanobenzylamin an Z-geschütztes Prolin gekoppelt. Durch Reaktion mit Hydroxylamin \times HCl wurde das Hydroxyamidin erhalten, das anschließend mit Acetanhydrid acetyliert wurde (Stüber et al., 1995; Judkins et al., 1996). Durch nachfolgende Hydrierung mit Pd/C als Katalysator unter H_2 -Atmosphäre erhält man das entschützte P2-P1-Segment mit terminaler Amidinogruppe. Das als Acetatsalz vorliegende Produkt wurde mit 0,5 M HCl in das Hydrochlorid (**70**) überführt, um eine Kopplung der Acetationen in nachfolgenden Schritten zu verhindern.

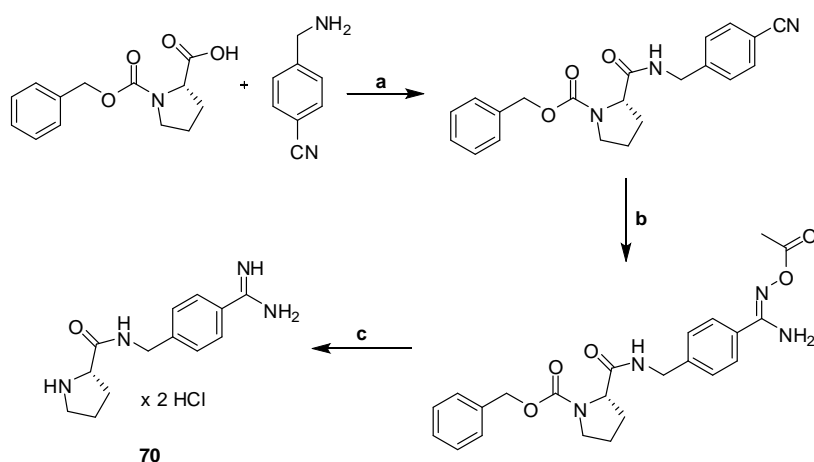


Abbildung 5.9 Synthese des P2-P1-Segments H-Pro-AMBA \times 2 HCl (**70**). **a:** Chlorkohlensäureisobutylester, *N*-Methylmorpholin in DMF; **b:** (i) Hydroxylamin \times HCl, DIPEA in EtOH; (ii) Acetanhydrid in Eisessig; **c:** (i) Pd/C in 90 % HAc, H_2 -Atmosphäre, (ii) 0,5 M HCl.

Die P3-Aminosäure wurde zur Synthese des P4-P3-Segments (**55**) zunächst mit Trimethylsilylchlorid und DIPEA in DCM umgesetzt (Abbildung 5.10). An das silylierte Intermediat wurde anschließend Benzylsulfonylchlorid gekoppelt (Schwarz et al., 1981). Alternativ wurde an einigen Aminosäuren der Benzylsulfonylrest im basisch-wässrigen Milieu unter Schotten-Baumann-Bedingungen eingeführt. Ein Nachteil dieser Variante ist jedoch, dass große Überschüsse des Benzylsulfonylchlorids verwendet werden müssen, da es in wässrigen Lösungen in kurzer Zeit zur entsprechenden Sulfonsäure hydrolysiert (King et al., 1992).

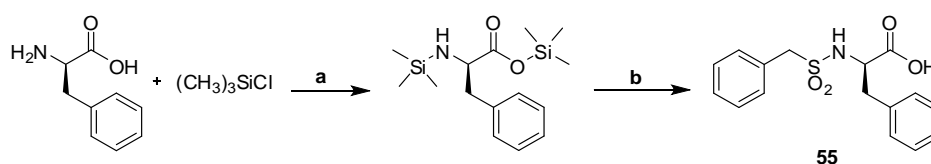


Abbildung 5.10 Synthese des P4-P3-Segments Bzls-D-Phe-OH (**55**). **a**: DIPEA in DCM; **b**: Benzylsulfonylchlorid, DIPEA.

In P3-Position des Inhibitors MI-0361 (Bzls-D-Phe(4-Amidino)-Pro-AMBA) wurde ein D-4-Amidinophenylalanin eingebaut. Die Synthese dieser Verbindung erforderte eine leichte Modifikation der Synthesestrategie. Zunächst erfolgte, wie zuvor beschrieben, die Einführung des Benzylsulfonylrestes an D-4-Cyanophenylalanin über die Silylierungsmethode (**59**). Durch Umsetzung mit Hydroxylamin \times HCl und nachfolgende Acetylierung wurde das Nitril in ein Acetylhydroxyamidin überführt (**61**). Analog zu der zuvor beschriebenen Synthese von MI-0317 folgte die Kopplung des P2-P1-Segments (**70**) mittels PyBOP. Die abschließende katalytische Hydrierung mit Pd/C unter H_2 -Atmosphäre ergab den finalen Inhibitor MI-0361 (Abbildung 5.11).

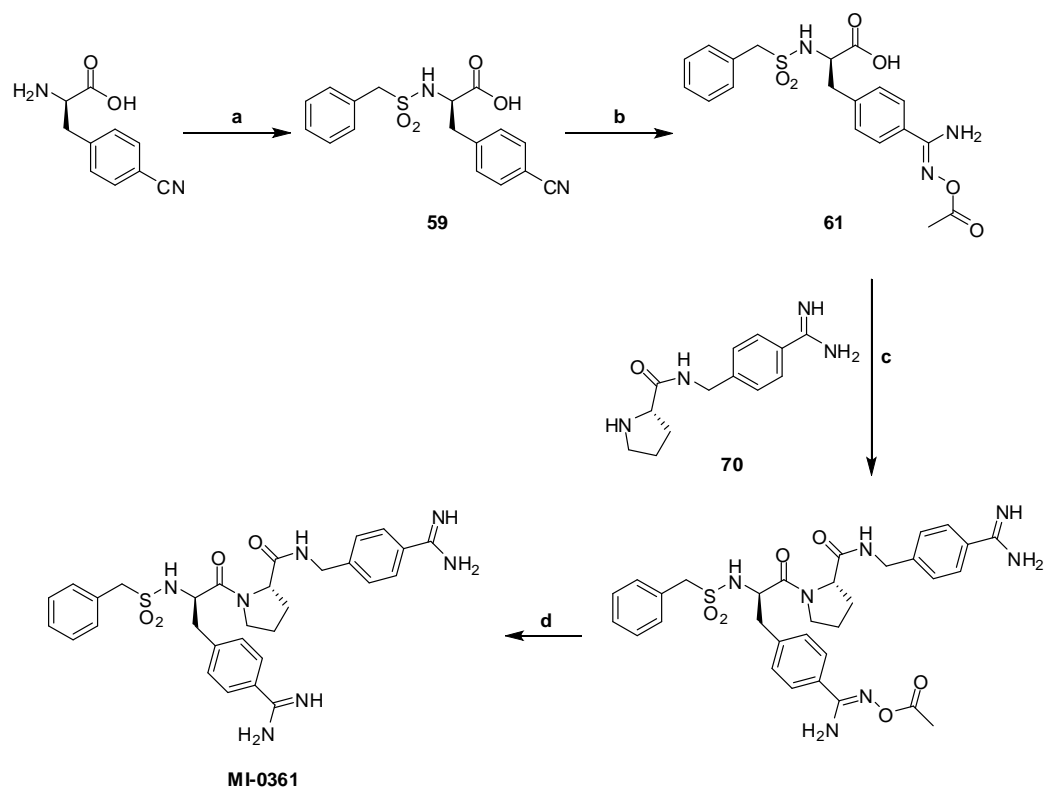


Abbildung 5.11 Synthese des Inhibitors MI-0361. **a:** (i) Trimethylsilylchlorid, DIPEA in DCM; (ii) Benzylsulfonylchlorid, DIPEA; **b:** (i) Hydroxylamin \times HCl, DIPEA in EtOH; (ii) Acetanhydrid in Eisessig; **c:** PyBOP, DIPEA in DMF; **d:** Pd/C in 90 % HAc, H_2 -Atmosphäre.

5.3.2 Substituierte D-Aspartat- und D-Glutamatreste in P3-Position

Die Inhibitoren aus dieser Serie sind von Ines Volk im Rahmen ihrer Diplomarbeit in der Zeit von Juni 2010 bis Dezember 2010 synthetisiert und enzymkinetisch charakterisiert worden.⁹ Deshalb wird nur die Synthese von MI-1074 exemplarisch beschrieben (Abbildung 5.12). Für experimentelle Details sei auf die Diplomarbeit verwiesen, die derzeit erstellt wird.

Die Synthese der Verbindungen mit *tert.*-butyl-geschützten D-Aspartat- bzw. D-Glutamatresten in P3-Position erfolgte analog der zuvor beschriebenen Strategie. Nach Abspaltung der Schutzgruppe mit 90 % TFA erfolgte die Kopplung der stickstoffhaltigen Heterozyklen mittels PyBOP.

⁹ Die praktischen Arbeiten wurden von mir betreut.

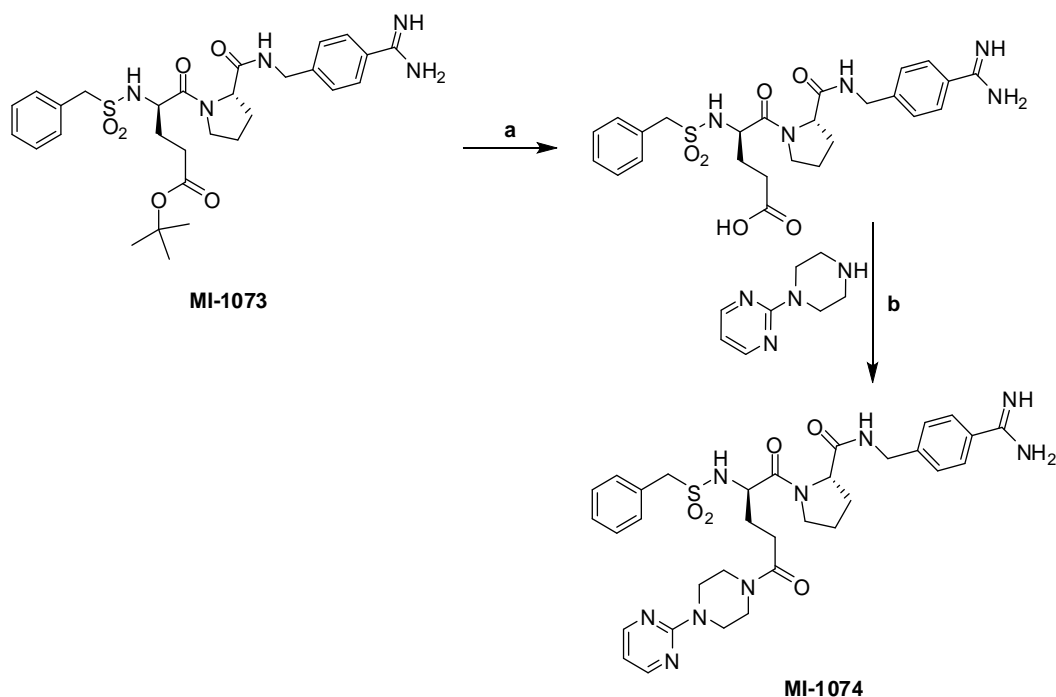


Abbildung 5.12 Synthese des Inhibitors MI-1074. **a:** 90 % TFA; **b:** PyBOP, DIPEA in DMF.

5.3.3 Modifizierung der P2-Position

In einer dritten Synthesereihe wurde der Einfluss verschiedener P2-Aminosäuren untersucht. Wie auch in den vorherigen Serien, wurden die P4-P3- und die P2-P1-Segmente getrennt synthetisiert und die finalen Inhibitoren durch Kopplung beider Bausteine erhalten. Als Beispiel ist die Synthese des Inhibitors MI-0381 in Abbildung 5.13 beschrieben.

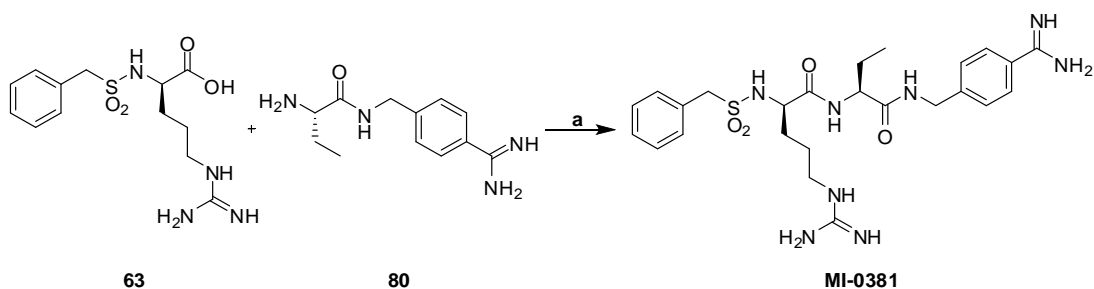


Abbildung 5.13 Synthese des Inhibitors MI-0381. **a:** PyBOP, DIPEA in DMF.

Bei diesen Inhibitoren wurde D-Arginin als P3-Rest verwendet, da es sich in der zuvor untersuchten Serie als besonders geeignet erwiesen hat. Obwohl der Einbau von D-homo-Arginin zu einer marginal wirksameren Verbindung geführt hat, umfasst die Synthese einen zusätzlichen Reaktionsschritt, in dem eine D-Lysinseitenkette mittels

1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin in einen Guanidinobutylrest umgewandelt wird. Die Einführung der Benzylsulfonylgruppe an H-D-Arg(NO₂)-OH erfolgte unter Schotten-Baumann-Bedingungen, anschließend wurde die Nitro-Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung mit Pd/C unter H₂-Atmosphäre in Methanol entfernt (Abbildung 5.14).

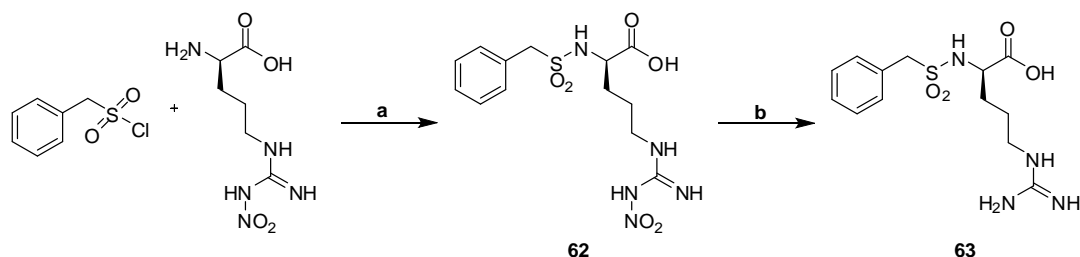


Abbildung 5.14 Darstellung des P4-P3-Segments Bzls-D-Arg-OH (**63**). **a**: 1 N NaOH in Wasser / Acetonitril (4:1); **b**: Pd/C, H₂-Atmosphäre, HAc, Methanol.

Das P2-P1-Segment entstand durch Kopplung der *N*_α-geschützten P2-Aminosäure mit 4-Amidinobenzylamin (Becker et al., 2010) mittels des Mischanhydridverfahrens, HBTU oder PyBOP (Abbildung 5.15). Anschließend wurden die Fmoc-, Z- oder Boc-*N*_α-Schutzgruppen durch geeignete Behandlung abgespalten. Der Vorteil der Mischanhydridmethode im Vergleich zu den PyBOP- und HBTU-Kopplungen ist, dass sie in der Regel sehr saubere Produkte liefert.

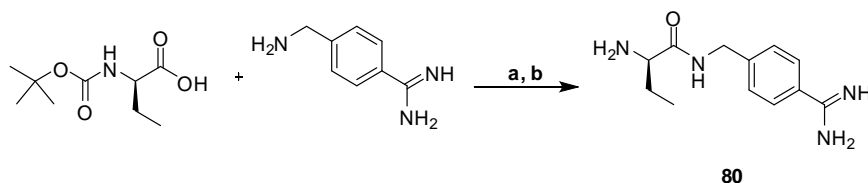


Abbildung 5.15 Synthese des P2-P1-Segments H-Abu-AMBA (**80**). **a**: Chlorkohlensäureisobutylester, *N*-Methylmorpholin in DMF; **b**: 90 % TFA.

Alternativ wurde 4-Aminoprolin als P2-Rest verwendet. Durch die zusätzliche Amino-Gruppe am Pyrrolidinring entsteht ein weiteres Stereozentrum im Molekül, so dass zwei 4-Aminoprolininhibitoren synthetisiert wurden. Die Synthese wurde teilweise unter Einsatz von Methoden der Festphasensynthese durchgeführt. Dazu wurde Chlortritylharz mit Fmoc-Pro-(4-Boc-Amino)-OH beladen und die Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF abgespalten. Anschließend wurde das P4-P3-Segment Benzylsulfonyl-D-Val-OH (**64**) mit HBTU an die α-Iminofunktion des Prolins gekoppelt. Nach Abspaltung vom Harz mit 1 % TFA in DCM unter Erhalt der Boc-Schutzgruppe erfolgte die Kopplung des 4-Amidinobenzylamins und die finale

Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in der Seitenkette des Aminoprolins (Abbildung 5.16).

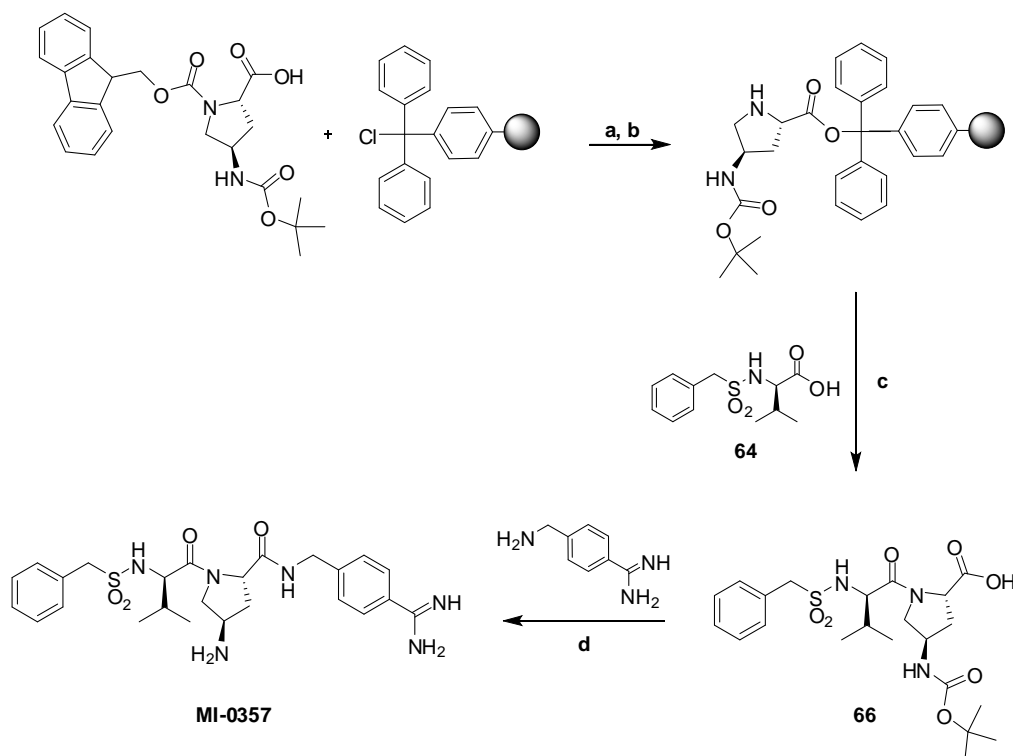


Abbildung 5.16 Synthese des Inhibitors MI-0357. **a:** (i) DIPEA in DCM; (ii) 3 × DMF, DIPEA, MeOH (17:2:1) **b:** 2 × 20 % Piperidin in DMF, anschließend mehrfaches Waschen mit DMF; **c:** (i) HBTU, HOBt, DIPEA in DMF; (ii) 1 % TFA in DCM; **d:** PyBOP, DIPEA in DMF.

5.3.4 Einbau chloresubstituierter Benzylamide in P1-Position

Neben 4-Amidinobenzylamid wurden 2,5-Dichlorbenzylamin und 3-Chlorbenzylamin als P1-Gruppe verwendet. Die Synthese ging wieder von Benzylsulfonyl-D-Arg(NO₂)-OH aus, an das Prolin-Methylester mittels PyBOP gekoppelt wurde. Nach Verseifung des Methylesters mit 1 M NaOH folgte die Entfernung der Nitroschutzgruppe durch katalytische Hydrierung mit Pd/C unter H₂-Atmosphäre. Die Hydrierung musste vor Einführung des chloresubstituierten Benzylamins erfolgen, da die aromatischen Chloratome unter den verwendeten Bedingungen nicht stabil sind. Der finale Inhibitor wurde durch PyBOP-Kopplung mit dem entsprechenden Benzylamin erhalten. Die Synthese des Inhibitors MI-0374 ist in Abbildung 5.17 dargestellt.

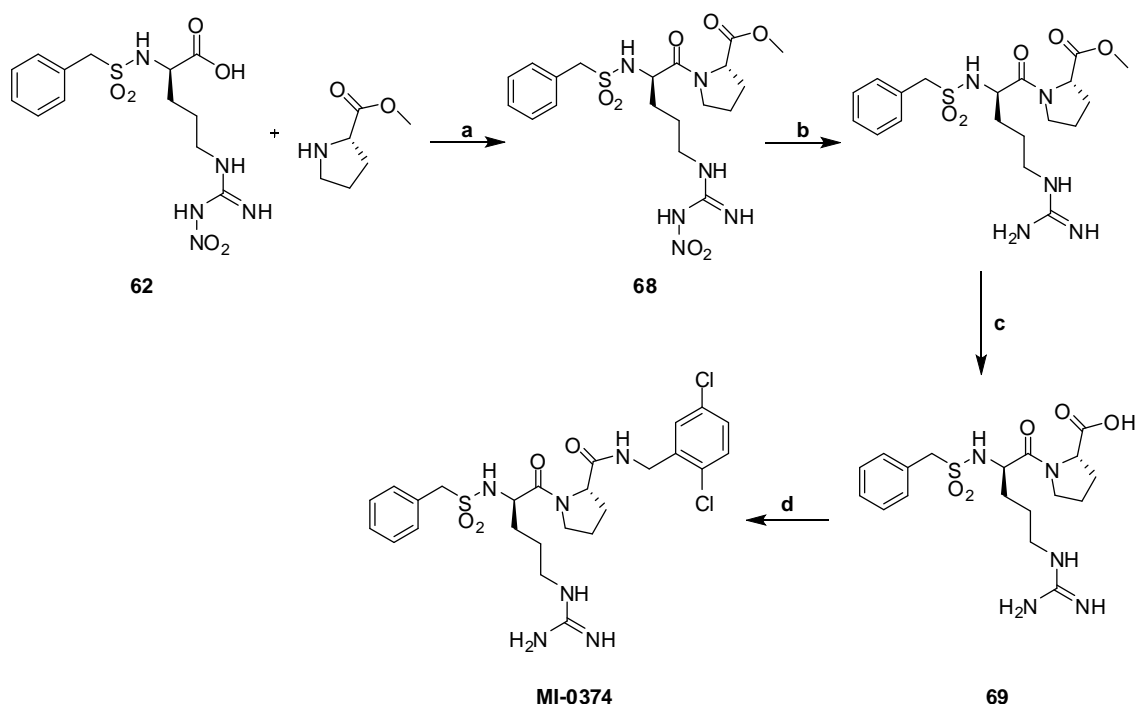


Abbildung 5.17 Synthese des Inhibitors MI-0374. **a:** PyBOP, DIPEA in DMF; **b:** Pd/C, H₂-Atmosphäre, 90 % HAc; **c:** 1 M NaOH in 50 % 1,4-Dioxan; **d:** 2,5-Dichlorbenzylamin, PyBOP, DIPEA in DMF.

5.4 Inhibitoren des TAPAP-Typs

Ein zweiter Inhibitortyp für HAT leitet sich von der Verbindung 3-TAPAP ab, die ursprünglich als Thrombininhibitor entwickelt wurde. 3-TAPAP ist die Abkürzung für Tosyl-3-Amidinophenylalanin-piperidid und wurde erstmals 1980 (Markwardt et al., 1980) beschrieben (Abbildung 5.18).

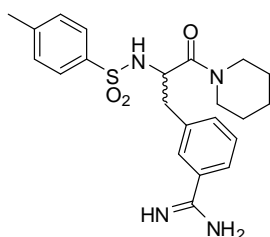


Abbildung 5.18 Strukturformel des Inhibitors 3-TAPAP.

Das C-terminale Piperidid besetzt im Thrombin die proximale S2-Tasche, während die Tosylfunktion die distale S3/S4-Tasche adressiert. In der S1-Tasche bildet das Amidin eine Salzbrücke zur Carboxylfunktion des Asp189. In den von uns synthetisierten Verbindungen wurden anstelle der Tosylgruppe α - und β -Naphthylsulfonylreste eingebaut, die sich in früheren Untersuchungen mit Thrombin als günstiger erwiesen haben

(Stürzebecher et al., 1997). Obwohl 3-TAPAP ursprünglich in racemischer Form synthetisiert wurde, konnte in späteren Kristallstrukturuntersuchungen festgestellt werden, dass das L-Konformer bevorzugt bindet (Bergner et al., 1995). Deshalb wurde das zentrale Phenylalaninderivat zur Synthese dieser Verbindungen in L-Konfiguration eingesetzt.

Neben den Inhibitoren mit einer Amidinofunktion in *meta*-Position des Phenylalanins wurden außerdem Verbindungen mit einer Amidrazonfunktion in *para*-Position synthetisiert. Derartige Verbindungen wurden erstmals zu Beginn der 1990er Jahre als Thrombininhibitoren beschrieben (Banner et al., 1993) und später von einer koreanischen Arbeitsgruppe wieder aufgegriffen (Kim et al., 1997). Für Thrombin wird so eine um den Faktor 50 wirksamere Hemmung im Vergleich zu einem Amidin in *para*-Position erreicht. Aufgrund struktureller Ähnlichkeit der S1-Taschen von HAT und Thrombin, sollten im Rahmen dieser Arbeit auch analoge Amidrazoninhibitoren synthetisiert und auf ihre Eignung als Leitstrukturen für die Entwicklung von HAT-Inhibitoren untersucht werden.

In Abbildung 5.19 ist zunächst exemplarisch die Synthese des Inhibitors MI-0311 dargestellt. Die Einführung des β -Naphthylsulfonylrestes an 3-Cyanophenylalanin erfolgte in Anlehnung an Schotten-Baumann-Bedingungen (**37**). Der Piperidinbaustein **41** wurde durch Veresterung von Isonipecotinsäure mit Thionylchlorid in Methanol gewonnen. Beide Zwischenprodukte wurden anschließend mittels PyBOP gekoppelt. Der Aufbau des Amidins wurde nach zuvor beschriebenen Verfahren (Stüber et al., 1995; Judkins et al., 1996) mit einem acetylierten Hydroxyamidin als Intermediat und anschließender katalytischer Hydrierung durchgeführt. Um die analogen Inhibitoren mit freier C-terminaler Carboxylfunktion zu erhalten, wurde der Methylester mit 1 M NaOH in einem Gemisch aus 1,4-Dioxan / Wasser (1:1) verseift.

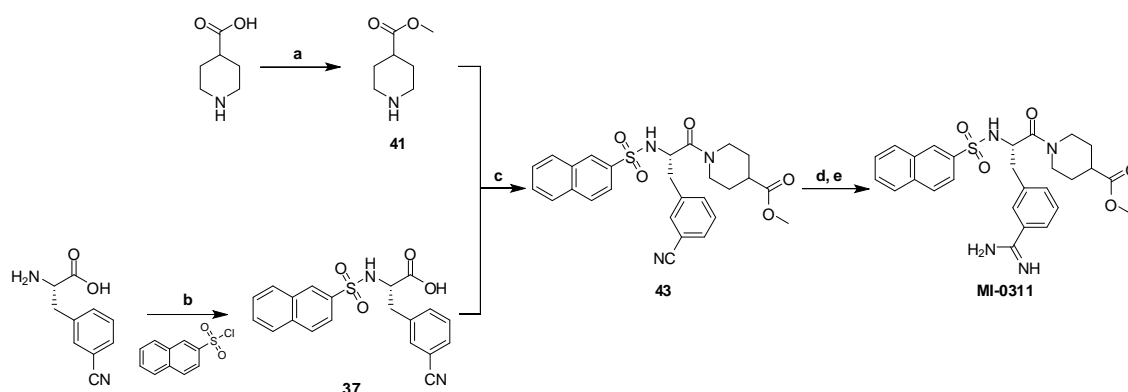


Abbildung 5.19 Synthese des Inhibitors MI-0311. **a:** Thionylchlorid in Methanol; **b:** DIPEA in DMF / Wasser (2:1); **c:** PyBOP, DIPEA in DMF; **d:** (i) Hydroxylamin, DIPEA in Ethanol; (ii) Acetanhydrid in Eisessig; **e:** Pd/C in 90 % HAc, H₂-Atmosphäre.

Der alternative 2-(Piperidin-4-yl)essigsäuremethylester **40** (Abbildung 5.20) wurde ausgehend von 4-Pyridinessigsäure erhalten, die in den Methylester überführt und anschließend mit Platin(IV)oxid unter Wasserstoffatmosphäre hydriert wurde (Egbertson et al., 1994).

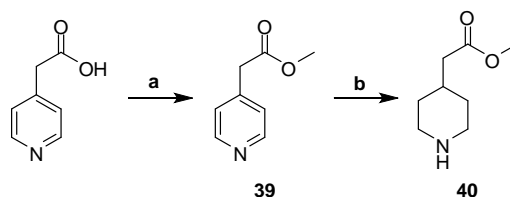


Abbildung 5.20 Synthese des 2-(Piperidin-4-yl)-essigsäuremethylesters. **a:** Thionylchlorid in Methanol; **b:** Platin(IV)oxid, H₂-Atmosphäre in 90 % HAc.

Die Synthese der 4-Amidrazonophenylalanin-Inhibitoren ging von den entsprechenden C- und N-terminal derivatisierten Cyanophenylalanin-Verbindungen aus, die analog zu den vorhergehenden Startverbindungen erhalten wurden. Als C-terminaler Rest wurde hier jedoch Piperidin bzw. Homopiperidin eingesetzt, um eine direkte Vergleichbarkeit mit früher beschriebenen Verbindungen zu ermöglichen. Außerdem wären aus den Methylestern mit dem im nachfolgenden Reaktionsschritt verwendeten Hydrazin die Carbonsäurehydrazide entstanden. Das Nitril wurde in einer Pinner-Reaktion mit HCl in 1,4-Dioxan und trockenem Isobutanol zu einem Imidoester umgesetzt, der mit zahlreichen Nucleophilen reagieren kann. Durch Reaktion mit Hydrazinhydrat entstanden die entsprechenden Amidrazone, während durch Einsatz von trockenem Ammoniak in Ethanol die Amidine erhalten wurden (Abbildung 5.21) (Roger and Neilson, 1961).

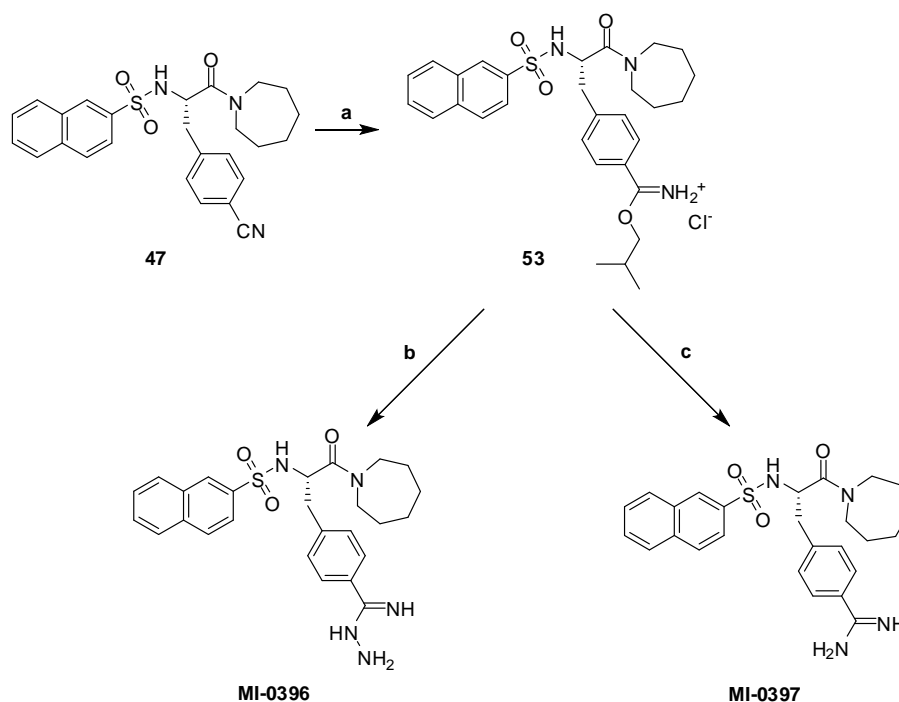


Abbildung 5.21 Darstellung der Inhibitoren MI-0396 und MI-0397 mittels einer Pinner-Reaktion.
a: Isobutanol, 4 M HCl in Dioxan; **b:** Hydrazinhydrat in Acetonitril; **c:** trockener Ammoniak in Ethanol.

Anstelle von Isobutanol können auch andere Alkohole, wie Ethanol oder Trifluorethanol, verwendet werden. In der Literatur wird die Pinner-Reaktion meist mit gasförmigem Chlorwasserstoff und nicht mit HCl in 1,4-Dioxan durchgeführt. Im großtechnischen Maßstab hingegen wird Acetylchlorid anstelle von Chlorwasserstoff verwendet (Shin et al., 2006). Dieser Ansatz führte hier aber zu schlechteren Ergebnissen im Vergleich zur Verwendung von HCl in 1,4-Dioxan.

Ein Nachteil dieser Strategie ist, dass die Darstellung des Pinner-Salzes sehr langsam über mehrere Tage bei 4 °C und nicht vollständig abläuft. So dauerte dieser Schritt bei den synthetisierten Inhibitoren im Durchschnitt eine Woche, in der täglich HCl in Dioxan nachdosiert wurde. Nach sieben Tagen waren ca. 80 % des Eduktes zu dem Imidoester umgesetzt und die Reaktion wurde abgebrochen. Die Reaktion des Pinner-Salzes mit dem Nucleophil hingegen verläuft innerhalb weniger Stunden und in guter Reinheit.

Obwohl diese Strategie prinzipiell auch zur Synthese der Amidine geeignet ist, wurde sie im Rahmen dieser Arbeit nur zur Synthese der Amidrazone verwendet. Amidine sind über Hydroxyamidine schneller und in größeren Ausbeuten zugänglich, so dass diese Methode beispielsweise auch im Multigrammmaßstab zur Synthese des Arznei-

stoffs Melagatran verwendet wird (Lila et al., 1998). Alternativ könnten Amidine auch durch Reaktion der Nitrilverbindungen mit Schwefelwasserstoff, nachfolgender Methylierung mit Methyljodid und anschließender Umsetzung mit Ammoniumacetat erhalten werden.

5.5 Hemmung der HAT durch substratanaloge Inhibitoren

Die Bestimmung der Hemmkonstanten für die synthetisierten Verbindungen erfolgte in Anlehnung an die für Furin verwendete Methode (Abschnitt 3.2). Die Spaltung des Substrates D-Cha-Pro-Arg-AMC wurde fluorometrisch in Abhängigkeit der Zeit gemessen und aus den erhaltenen Zeit-Umsatz-Kurven die jeweilige Steigung berechnet. Diese *steady-state*-Geschwindigkeiten wurden gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen und an Gleichung 1 auf Seite 130 angepasst, um den K_i -Wert zu erhalten. Parallel dazu wurden die Hemmkonstanten auch nach der Methode nach Dixon bestimmt (Abbildung 5.22).

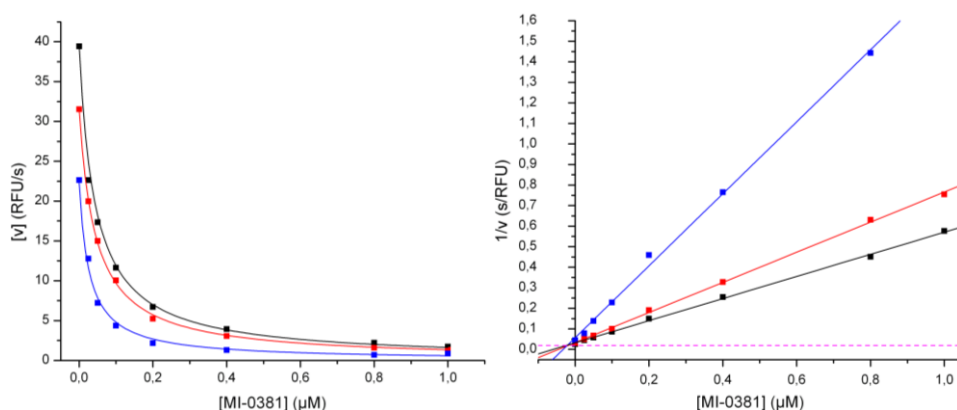
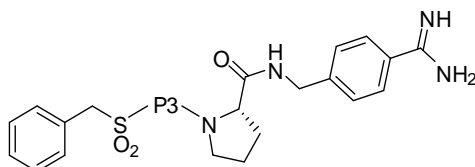


Abbildung 5.22 Bestimmung der Hemmkonstanten des Inhibitors MI-0381 (verwendete Substratkonzentrationen: schwarz 200 μM , rot 100 μM und blau 50 μM). Links: Auftragung der *steady-state*-Geschwindigkeiten als Funktion der Inhibitorkonzentration und Anpassung der Messwerte an Gleichung 1. Rechts: Reziproke Auftragung der Messwerte nach Dixon. Die waagerechte, gestrichelte Linie stellt $1/V_{max}$ dar.

5.5.1 Modifikationen des P3-Restes

Die substratanaloge Inhibitoren der ersten Serie inhibieren HAT mit Hemmkonstanten zwischen 13 und 311 nM (Tabelle 5.2). Eine Ausnahme ist Inhibitor MI-1067 mit einem K_i -Wert von 1,4 μM , dessen negativ geladene Carboxylfunktion in P3-Position offenbar für die Bindung an HAT unvorteilhaft ist. Dieser Wert ist im Vergleich zur wirksamsten Verbindung MI-0323 mit einem D-hArg in P3-Position ungefähr hundertfach höher.

Tabelle 5.2 Hemmung der HAT durch substratanaloge Inhibitoren mit unterschiedlichen P3-Resten. Alle substratanaloge Inhibitoren in diesem Abschnitt sind nach aufsteigenden K_i -Werten geordnet.

MI-	P3	K_i (nM)
0323	D-hArg	13
0001 ¹⁰	D-Arg	19
1073	D-Glu(OtBu)	36
1066	D-Asp(OtBu)	38
0322	D-Lys	40
0326	D/L-hAla(2Pyr)	41
0321	D-Lys(Cbz)	53
0320	D-hPhe	63
0354	D-Val	76
0317	D-Phe	98
0003 ¹⁰	D-Cha	108
0353	D-Leu	120
0361	D-Phe(4-Amidino)	168
0327	D-Phe(4-CN)	311
1067	D-Asp	1425

Diese Serie zeigt, dass Prolin in P2-Position für die Entwicklung von HAT-Inhibitoren geeignet ist. Aufgrund des zyklischen Pyrrolidinrings führt der Einbau von Prolin zu Verbindungen mit stabiler Konformation, da der Torsionswinkel Φ (Abbildung 5.23) des fünfgliedrigen Zyklus mit $-65^\circ \pm 15^\circ$ konformativ fixiert ist.

¹⁰ Die Verbindung wurde von Prof. Dr. Torsten Steinmetzer synthetisiert.

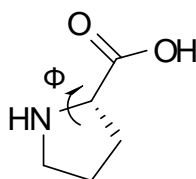


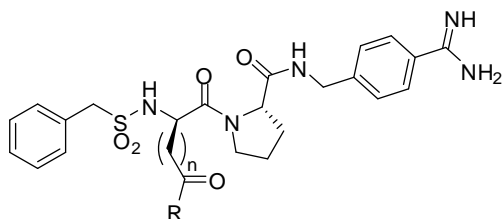
Abbildung 5.23 Darstellung des Torsionswinkels Φ in der Aminosäure Prolin.

Allerdings sind auch zahlreiche substratanaloge Inhibitoren anderer trypsinartiger Serinproteasen mit einem P2-Prolin bekannt; speziell für Thrombinhemmstoffe ist Prolin besonders geeignet (Bajusz et al., 1978). Verbindung MI-0001 wurde bereits früher als Hemmstoff von Thrombin ($K_i = 3,5$ nM), Faktor Xa ($K_i = 2,4$ nM), Plasmakallikrein ($K_i = 8,3$ nM), Matriptase ($K_i = 55$ nM) und Matriptase 2 ($K_i = 170$ nM) beschrieben und ist damit ein sehr unspezifischer Hemmstoff vieler trypsinartiger Serinproteasen (Hellstern et al., 2007; Sisay et al., 2010).

Der Austausch der D-Argininderivate in P3-Position durch andere D-Aminosäurereste führt zu weniger wirksamen HAT-Hemmstoffen, viele Verbindungen besitzen jedoch Hemmkonstanten < 100 nM. Darunter sind mehrere Inhibitoren mit hydrophoben Resten, andererseits auch Inhibitoren mit positiv geladener Seitenkette in P3. Auch die *tert.*-butyl-geschützten D-Asp- und D-Glu-Derivate MI-1073 und MI-1066 inhibieren HAT mit K_i -Werten unter 40 nM.

5.5.2 Modifikationen des P3-Restes mit D-Asp- und D-Glu-Derivaten

Das Ergebnis der ersten Inhibitorserie war, dass sowohl basisch-protonierbare, aber auch hydrophobe Reste für den Einbau in P3-Position geeignet sind. Deshalb wurden Inhibitoren mit D-Asp und D-Glu-Seitenkette für eine zweite Inhibitorserie genutzt, deren Seitenketten mit verschiedenen sekundären Aminen modifiziert wurden. Dadurch wurden neue Inhibitoren mit protonierbaren, aber auch hydrophoben Seitenketten zugänglich (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3 Hemmung der HAT durch substratanaloge Inhibitoren mit seitenkettenmodifizierten D-Asp- und D-Glu-Resten in P3-Position.

MI-	n	R	K _i (nM)
1074	2		17
1061	2		38
1071	1		43
1060	2		68
1072	1		73
1063	1		135
1069	1		149
1064	1		158
1070	1		183
1062	1		202
1068	1		210
1065	1		221

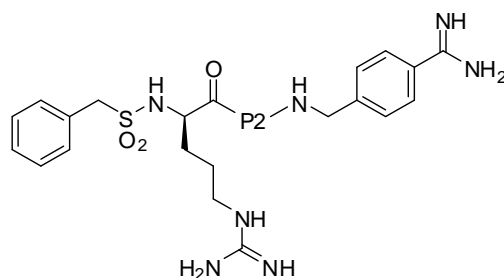
Im Allgemeinen sind die von einem D-Glu-Rest abgeleiteten Inhibitoren um den Faktor drei wirksamer, als die entsprechenden D-Asp-Derivate. Die stärkste Hemmwirkung auf HAT besitzt Verbindung MI-1074 mit einem K_i -Wert von 17 nM, bei der ein 1-(2-Pyrimidyl)piperazin an die Seitenkette des D-Glu gekoppelt wurde. Alle anderen Verbindungen haben eine etwas geringere Affinität als die *tert.*-Butylester, die als Startpunkt dieser Serie dienten und hemmen HAT mit K_i -Werten im Bereich von 40 bis 220 nM.

5.5.3 Modifikationen des P2-Restes

Für die Suche nach geeigneten P2-Resten in einer dritten Inhibitorserie wurde Bzls-D-Arg-OH als P4-P3-Segment verwendet, da die Synthese seitenkettenmodifizierter D-Asp- und D-Glu-Derivate zwei zusätzliche Reaktionsschritte umfasst und daher aufwendiger ist (Tabelle 5.4).

Die Inhibitoren MI-0380 und MI-0381 mit den aliphatischen, ungewöhnlichen Aminosäuren Abu und Nva besitzen eine niedrige Hemmkonstante von 14 bzw. 15 nM und sind damit ähnlich wirksam wie Hemmstoffe mit einem P2-Prolin. Auch der Einbau von Ala (MI-0371), Val (MI-0378) oder Ile (MI-0382) führt zu Inhibitoren mit K_i -Werten < 30 nM. Weniger geeignet hingegen sind Verbindungen mit einem basischen Arginin (MI-0360) oder einem sauren Aspartatrest in P2-Position (MI-0376). Auch das sterisch anspruchsvolle, hydrophobe *tert.*-butyl-geschützte Aspartatderivat MI-0375 ist ungeeignet.

Sowohl Urokinase als auch HAT besitzen in Position 99 ein Histidin oberhalb der S2-Tasche. Dementsprechend wurde für Inhibitoren der Urokinase ebenfalls eine Präferenz für kleine, sterisch nicht anspruchsvolle Aminosäuren in P2-Position beschrieben. So ist ein substratanaloger Inhibitor mit einem Ala als P2-Rest wirksamer ($K_{i(\text{Urokinase})} = 7,7$ nM) als das entsprechende P2-Prolin Derivat mit einem K_i -Wert für Urokinase von 13 nM. (Schweinitz et al., 2004). Aus der Kristallstruktur der Urokinase im Komplex mit dem Inhibitor Bzls-D-Ser-Ser-AMBA ist bekannt, dass die Seitenkette des P2-Serins keine Interaktionen mit dem Protein eingeht und in die Richtung des Lösungsmittels gerichtet ist (Schweinitz et al., 2004). Ohne Kristallstruktur ist es deshalb momentan nicht erklärbar, warum neben Prolin auch 2-Aminobuttersäure und Norvalin in HAT-Inhibitoren besonders geeignet sind.

Tabelle 5.4 Hemmung der HAT durch substratanaloge Inhibitoren mit unterschiedlichen P2-Resten.

MI-	P2	K _i (nM)
0381	Abu	14
0380	Nva	15
0378	Val	22
0382	Ile	23
0371	Ala	30
0367	Lys(Cbz)	34
0366	Ser	34
0377	Leu	47
0379	Phe	57
0376	Asp	422
0017¹¹	Gly	430
0360	Arg	457
0375	Asp(OtBu)	512

Obwohl die beiden folgenden P2-Aminoprolin Inhibitoren (Abbildung 5.24) im Gegensatz zu den Verbindungen aus Tabelle 5.4 einen D-Valinrest in P3-Position besitzen¹², ist der Einfluss der Aminosubstitution am Pyrrolidinring durch Vergleich mit Inhibitor MI-0354 möglich, der HAT mit einem K_i-Wert von 76 nM inhibiert. Beide Aminopro-

¹¹ Diese Verbindung war im Arbeitskreis bereits vorhanden (Schweinitz et al., 2006).

¹² Diese Verbindungen wurden als Thrombinhemmstoffe synthetisiert, aber auch mit HAT untersucht.

linderivate hemmen HAT jedoch schwächer, so dass keine weiteren Analoga synthetisiert wurden.

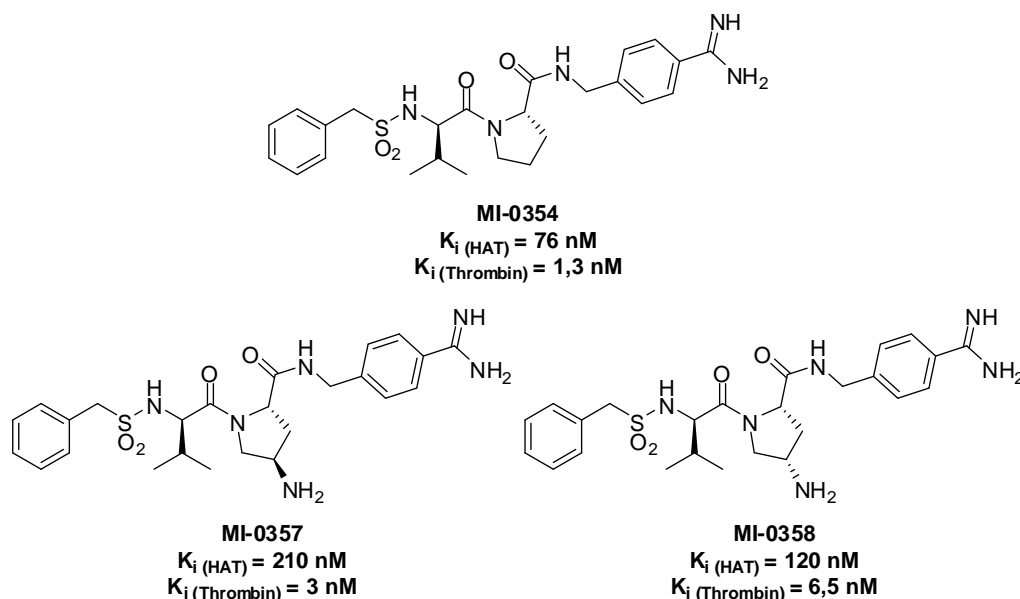


Abbildung 5.24 Substratanaloge Inhibitoren mit Prolin und Prolinderivaten in P2-Position.

5.5.4 Modifikationen des P1-Restes mit chloresubstituierten Benzylamiden

Studien mit den verwandten trypsinartigen Serinproteasen Thrombin und Faktor Xa haben gezeigt, dass substratanaloge Inhibitoren mit *meta*-chloresubstituierten Benzylamidderivaten in P1-Position geeignete Hemmstoffe dieser Proteasen darstellen. Obwohl diese Verbindungen keine basischen Amidino- oder Guanidinogruppen in P1-Position besitzen, wurden für zahlreiche Derivate Hemmkonstanten im niedrig nanomolaren Bereich bestimmt (Lumma et al., 1998; Tucker et al., 1998; Dönnecke et al., 2007). Es wurde diskutiert, dass eine Chlor- π -Interaktion in einer *edge-on*-Konfiguration mit dem Tyr228 in der S1-Tasche für die starke Bindung dieser Derivate verantwortlich ist (Baum et al., 2009). Interessanterweise wurden andere trypsinartige Serinproteasen, wie Trypsin, Urokinase oder Plasmin, durch solche *meta*-Chlorbenzylamide nur wenig gehemmt, obwohl alle trypsinartigen Proteasen ein Tyrosin in Position 228 besitzen. Sie unterscheiden sich jedoch im Rest 190: Während Thrombin und Faktor Xa dort ein Ala190 besitzen, befindet sich in Plasmin, Urokinase und Trypsin ein Ser190 in dieser Position. Deshalb wurde vermutet, dass HAT mit einem Ala190 möglicherweise auch durch solche *meta*-chloresubstituierten Benzylamide hemmbar ist, und es wurden zwei Inhibitoren mit einem 3-Chlorbenzylamid und einem

2,5-Dichlorbenzylamid in P1-Position synthetisiert (Abbildung 5.25). Jedoch zeigen die K_i -Werte, dass der Verlust der Amidinfunktion bei beiden Verbindungen nicht durch die Chloratome kompensiert werden kann und beide Verbindungen nur sehr schwache HAT-Hemmstoffe sind.

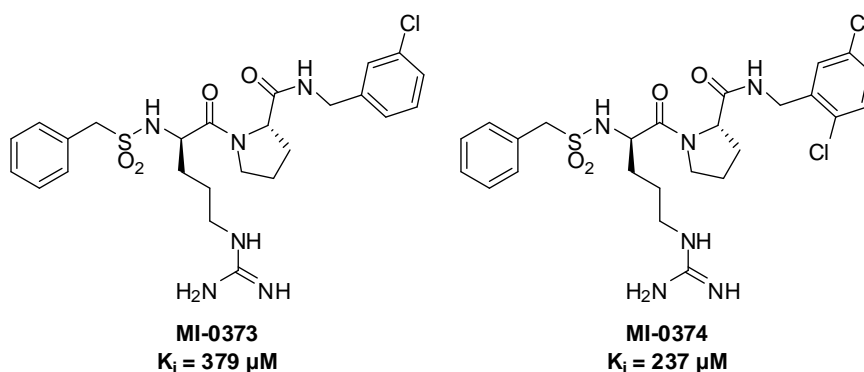


Abbildung 5.25 Substratanaloge Inhibitoren mit 3-Chlorbenzylamin und 2,5-Dichlorbenzylamin in P1-Position.

5.6 Hemmung der HAT durch Inhibitoren des TAPAP-Typs

Wie bereits beschrieben, sind Inhibitoren des TAPAP-Typs bekannte Hemmstoffe des Thrombins, der Urokinase und der Matriptase. Um eine weitere Leitstruktur für Inhibitoren der HAT zu identifizieren, wurden mehrere TAPAP-Derivate synthetisiert, die jedoch teilweise auch bereits aus der Literatur bekannt waren.

Die synthetisierten Verbindungen können in zwei Gruppen zusammengefasst werden: In einer ersten Serie wurde 3-Amidinophenylalanin am N-Terminus mit einem α - oder β -Naphthylsulfonylrest derivatisiert. Am C-Terminus wurden Isonipecotinsäure- und 2-(Piperidin-4-yl)essigsäuremethylester gekoppelt und durch Verseifung zusätzlich die Verbindungen mit den korrespondierenden freien Carboxylgruppen dargestellt (Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5 Hemmung der HAT durch Inhibitoren des 3-TAPAP-Typs.¹³

MI-	R ₁	R ₂	K _i (μM)
0311			0,7
0312			2,6
0313			0,8
0314			4,5
0315			1,1
0316			7,0
0369			3,9

Der wirksamste HAT-Inhibitor aus dieser ersten Serie ist das Isonipecotinsäuremethylesterderivat MI-0311 mit einem K_i-Wert von 0,7 μM. Die analoge Verbindung mit freier Carboxylgruppe ist ein ca. dreifach schwächerer Hemmstoff. Auch die anderen dargestellten Methylester MI-0313 und MI-0315 sind wirksamer als ihre korrespondierenden Hemmstoffe mit freien Carbonsäuren MI-0312 und MI-0314. Interessanterweise ist

¹³ Die Inhibitoren MI-0311 und MI-0312 wurden bereits in der Literatur beschrieben (Stürzebecher et al., 1995)

die Piperididverbindung MI-0369 im Vergleich zu Inhibitor MI-0312 mit freier Isonipe-cotinsäure noch weniger wirksam. Am N-Terminus führt der Einbau eines β -Naphthylsulfonylrestes zu etwas aktiveren Verbindungen im Vergleich zu den Inhibi-toren mit einem α -Naphthylsulfonylrest.

In der zweiten Serie wurde das 3-Amidinophenylalanin durch ein 4-Amidrazonophenyl-alanin ausgetauscht. Wie bereits im Syntheseabschnitt beschrieben, ist es so gelungen hochwirksame Thrombinhemmstoffe zu entwickeln, die Thrombin stärker als Trypsin hemmen (Kim et al., 1997). Aus Kristallstrukturuntersuchungen ist bekannt, dass Thrombin ein Alanin, Trypsin hingegen ein Serin an Position 190 in der S1-Tasche aufweist. Dies führt im Falle der Enzyme mit einem Ala190 zu einer leicht vergrößerten S1-Tasche im Vergleich zu den Proteasen mit einem Ser190. Dieser freie Raum kann von der räumlich größeren Amidrazonfunktion adressiert werden, wie es in Abbildung 5.26 schematisch dargestellt ist.

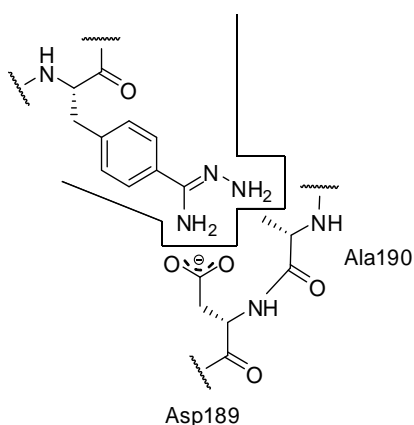
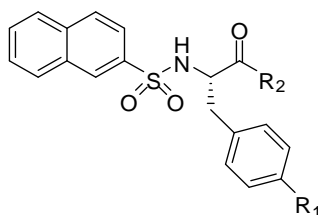


Abbildung 5.26 Schematische Darstellung der Bindung des 4-Amidrazonophenylalaninrestes in der S1-Tasche einer trypsinartigen Serinprotease mit einem Ala190-Rest. Die Amidrazongruppe bindet optimal in die größere S1-Tasche; dies ist im Falle der Ser190-Proteasen nicht möglich. Darstellung modifiziert nach (Kim et al., 1997).

Da auch HAT einen Alaninrest an dieser Position aufweist, wurden solche Amidrazonophenylalanin-Verbindungen mit einem N-terminalen β -Naphthylsulfonylrest und einem C-terminalen Piperidid- bzw. Homopiperididrest nachsynthetisiert (Tabelle 5.6).

Tabelle 5.6 Hemmung der HAT und des Thrombins durch Inhibitoren des 4-TAPAP-Typs.¹⁴

MI-	R ₁	R ₂	K _i (μM)	
			HAT	Thrombin
0396			> 500	0,0037
0383			> 500	0,0043
0397			42	n.b.

n.b. nicht bestimmt

Allerdings erwiesen sich die Inhibitoren mit einer Amidrazonfunktion in Position vier des Phenylalanins (MI-0396, MI-0383) als völlig unwirksam gegenüber HAT (Tabelle 5.6). Deshalb wurden keine weiteren Verbindungen dieses Typs synthetisiert. Das als Referenz hergestellte 4-Amidinophenylalaninderivat MI-0397 ist mit einem K_i-Wert von 42 μM auch nur ein relativ schwacher HAT-Hemmstoff. Offenbar kann die S1-Tasche der HAT, im Gegensatz zum Thrombin, mit einer 4-Amidrazonofunktion nicht adressiert werden. Wie aus der Literatur bekannt, hemmen MI-0396 und MI-0383 Thrombin mit K_i-Werten von 3,7 bzw. 4,3 nM sehr stark. Bisher liegen jedoch keine Informationen über den Bindungsmodus solcher Amidrazonderivate in der HAT vor, die eine Erklärung für die fehlende Affinität liefern könnten.

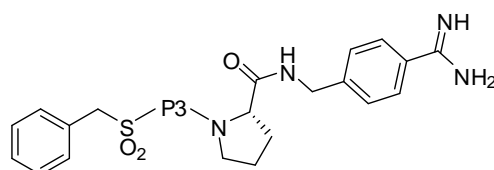
¹⁴ Die Inhibitoren MI-0396 und MI-0397 wurden bereits in der Literatur beschrieben (Kim et al., 1997).

Die Versuche, in Analogie zu den Thrombinhemmstoffen neue HAT-Inhibitoren durch Verwendung eines 4-Amidrazonophenylalanin-Motivs oder durch Einbau von *meta*-chlorsubstituierten Benzylamiden in die substratanalogen Inhibitoren zu entwickeln, waren nicht erfolgreich. Dies war überraschend, da in früheren Arbeiten postuliert wurde, dass eine Voraussetzung für die Thrombinhemmung durch solche Derivate der Ala190-Rest ist, der auch in der HAT vorhanden ist.

5.7 Untersuchungen zur Selektivität

Zur Familie der trypsinartigen Serinproteasen gehören ca. 70 Vertreter, die eine hohe Sequenzhomologie im Bereich des aktiven Zentrums aufweisen. Die Entwicklung von spezifischen, substratanalogen Inhibitoren ist somit schwierig, da oft auch andere Proteasen aus dieser Familie gehemmt werden. Deshalb wurden aus jeder Inhibitorserie einige Derivate ausgewählt und zusätzlich deren Hemmwirkung auf die Proteasen Thrombin und Faktor Xa aus der Gerinnungskaskade sowie für das fibrinolytische Enzym Plasmin bestimmt.

In Tabelle 5.7 sind die Hemmkonstanten für die Inhibitoren mit einem Prolin in P2-Position zusammengestellt, die sich in ihrem P3-Rest unterscheiden.

Tabelle 5.7 Hemmung von Thrombin, Faktor Xa, Plasmin und HAT durch substratanaloge Inhibitoren mit Prolin in P2-Position.

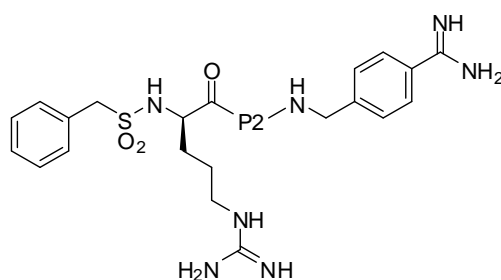
MI-	P3	K _i (nM)			
		HAT	Thrombin	FXa	Plasmin
0323	D-hArg	13	0,4	2,7	18
0001	D-Arg	19	3,5	2,9	39
0322	D-Lys	40	1,0	52	63
0321	D-Lys(Cbz)	53	0,4	17	12
0326	D/L-hAla(2Pyr)	41	1	2,2	95
0317	D-Phe	98	0,06	77	89
0320	D-hPhe	63	0,8	14	63
0003	D-Cha	108	0,1	35	n.b.
0361	D-Phe(4-Amidino)	168	2,5	149	165
0354	D-Val	76	1,3	12	33
0353	D-Leu	120	0,9	37	24
1073	D-Glu(OtBu)	36	6,7	31	1520
1060	D-Glu-(Piperazin)	68	13	565	114
1074	D-Glu-((2-Pyrimidyl)-piperazin)	17	5,2	129	23130
1061	D-Glu-(1-Cbz-piperazin)	38	9,8	397	1160

n.b. nicht bestimmt

Die K_i-Werte zeigen, dass einige Inhibitoren Thrombin, Faktor Xa und Plasmin stärker als HAT hemmen. Die getesteten Inhibitoren aus der Serie mit sekundären Aminen in der Seitenkette von D-Asp und D-Glu (MI-1060, MI-1061, MI-1074) weisen eine gewisse Selektivität gegenüber Faktor Xa und Plasmin auf, sind aber potente Thrombininhibi-

toren mit K_i -Werten < 15 nM. Besonders die Verbindungen MI-0001 und MI-0323 mit einem D-Arg bzw. D-hArg in P3-Position sind deutlich stärkere Thrombin- und Faktor Xa-Inhibitoren. Aus vielen Inhibitorstrukturen ist bekannt, dass Prolin ein besonders geeigneter P2-Rest für Thrombininhibitoren ist, da der Pyrrolidinring perfekt unter den 60er-Loop des Thrombins (Tyr60A, Pro60B, Pro60C und Trp60D) binden kann (Steinmetzer and Stürzebecher, 2004). Deshalb ist es mit einem P2-Prolin kaum möglich, selektive Hemmstoffe für andere trypsinartige Proteasen zu entwickeln. Der Austausch des Prolins kann zu Inhibitoren mit verbesserter Selektivität führen. So vergrößert der Einbau eines 4-Aminoprolins in P2-Position die Hemmkonstante für Thrombin ungefähr um den Faktor 30 im Vergleich zu dem P2-Prolinderivat (Abbildung 5.24 auf Seite 106). Die K_i -Werte weiterer Hemmstoffe mit unterschiedlichen P2-Resten und Bzls-D-Arg-OH als P4-P3-Segment sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst.

Tabelle 5.8 Hemmung von Thrombin, Faktor Xa, Plasmin und HAT durch substratanaloge Inhibitoren mit D-Arginin in P3-Position.



MI-	P2	K_i (nM)			
		HAT	Thrombin	FXa	Plasmin
0366	Ser	34	503	19	161
0017	Gly	430	1400	3,5	2200
0381	Abu	14	29	2,1	3030
0380	Nva	15	68	37	2110
0378	Val	22	66	21	2810
0371	Ala	30	74	1,4	590

Durch den Austausch des Prolins im Inhibitor MI-0001 durch ein Serin (MI-0366) wurde die Affinität zu Thrombin drastisch verringert. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für

homologe Inhibitoren der Urokinase beschrieben (Schweinitz et al., 2004). Der Inhibitor MI-0380 mit einem Norvalin in P2-Position weist mit einer Hemmkonstante von 15 nM als einzige Verbindung eine höhere Affinität zur HAT als zu den anderen getesteten Proteasen auf. Sie ist damit die selektivste Verbindung dieser substratanalogen Inhibitoren und daher ein interessanter Kandidat, um die Hemmung der Vermehrung von Influenzaviren in Zellkultur zu untersuchen.

5.8 Untersuchungen zur Hemmung der Virusausbreitung¹⁵

Die Infektiosität der Influenzaviren hängt von der korrekten Spaltung ihres Oberflächenglykoproteins Hämagglutinin ab (Klenk and Garten, 1994). Nach der enzymkinetischen Charakterisierung wurden ausgewählte Inhibitoren bezüglich ihrer Hemmwirkung auf die Vermehrung von Influenzaviren in Zellkultur untersucht. Die verwendeten MDCK-Zellen exprimieren doxycyclin-abhängig HAT oder die verwandte Serinprotease TMPRSS2, besitzen sonst aber keine eigenen Proteasen, die das Hämagglutinin effektiv spalten können (vgl. Abschnitt 4.5 auf Seite 78). Deshalb können diese Zellen zur Bestimmung der Hemmwirkung von Inhibitoren auf die Vermehrung von Influenzaviren verwendet werden, deren Hämagglutinin durch diese Proteasen gespalten wird. Nach erfolgter Infektion durch Influenzaviren wurden die entsprechenden Inhibitoren zugesetzt und die Zellen 24 Stunden inkubiert, um eine multizyklische Virusvermehrung zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Viren in den infizierten Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen das virale Nukleoprotein immunohistochemisch angefärbt. Hierbei können infizierte Zellen sowie eine kometenförmige Virusausbreitung auf benachbarte Zellen durch Blaufärbung nachgewiesen werden. Wird durch die Inhibitoren keine Hemmung der HAT bewirkt, werden - wie in der Kontrolle ohne Inhibitor - fast alle Zellen infiziert und damit auch angefärbt. Je weniger blaufgefärbte, kometenförmige Ansammlungen von infizierten Zellen erkennbar sind, desto stärker ist die Hemmwirkung der Verbindungen in diesen Experimenten.

In einer ersten Versuchsreihe wurden substratanaloge Inhibitoren mit einem Prolin in P2-Position getestet (Abbildung 5.27). Als Kontrolle wurde Aprotinin verwendet, das

¹⁵ Die in diesem Abschnitt dargestellten Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Garten am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg von Dr. Eva Böttcher-Friebertshäuser und Catharina Freuer durchgeführt.

bei einer Konzentration von 25 μM die Virusvermehrung vollständig unterdrückt. In den inhibitorfreien Versuchsansätzen waren ohne Zugabe von Doxycyclin ausschließlich einzelne, initial infizierte Zellen nachweisbar, während im Falle der doxycyclin-induzierten HAT-Expression eine multizyklische Virusreplikation und Ausbreitung der Infektion in den MDCK-Zellen beobachtet wurde (obere Zeile in Abbildung 5.27). Die stärkste Hemmung der Virusausbreitung bei einer Konzentration von 10 μM bewirkten die Inhibitoren mit einem D-Lysin (MI-0322), D-Arginin (MI-0001) oder D-hArg (MI-0323) in P3-Position, die sich auch in den enzymkinetischen Messungen als sehr effektive HAT-Hemmstoffe erwiesen haben (K_i -Wert ≤ 40 nM). Die Verbindungen MI-0001 und MI-0322 wurden aufgrund ihrer starken Hemmwirkung auch in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt, hatten dann aber nur noch einen geringen Einfluss auf die Virusausbreitung. Die Inhibitoren mit einem hydrophoben D-Aminosäurerest in P3-Position (MI-0320 mit D-hPhe, MI-0321 mit D-Lys(Cbz) und MI-0003 mit D-Cha) hemmten die Virusausbreitung deutlich schwächer, obwohl ihre K_i -Werte nur geringfügig größer sind als die Hemmkonstanten der anderen getesteten Verbindungen.

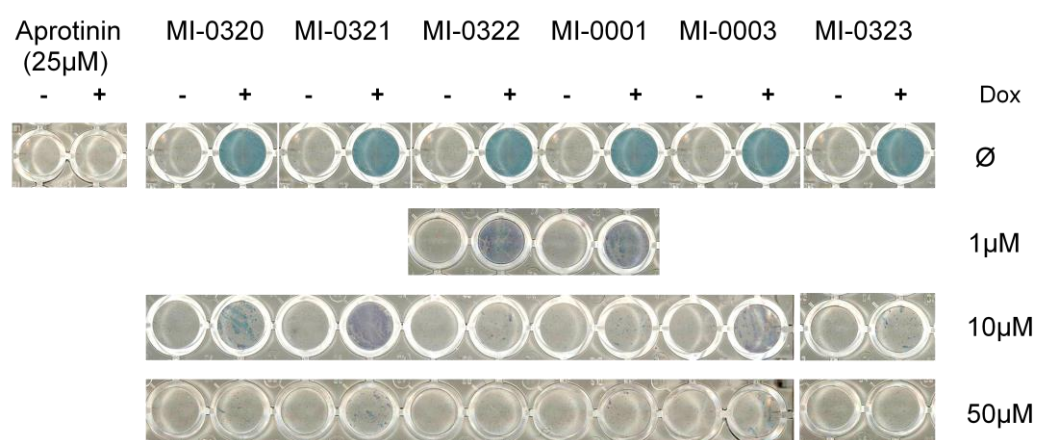


Abbildung 5.27 Einfluss substratanaloger Inhibitoren auf die multizyklische Vermehrung von Influenzaviren (A/Memphis/14/96 (H1N1)).

Zusätzlich zu den beschriebenen Ausbreitungstests in MDCK-HAT-Zellen wurde mit dem Inhibitor MI-0001 und dem Referenzinhibitor Aprotinin eine Hemmung der Virusvermehrung in Atemwegsepithelzellen untersucht. Dazu wurden humane Atemwegsepithelzellen (Calu-3) mit dem gleichen Influenzastamm infiziert, gewaschen und mit inhibitorhaltigem Medium für 72 Stunden inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben vom Zellkulturüberstand abgenommen und die Zahl infektiöser Viruspartikel pro Milliliter durch einen Plaque-Test bestimmt. Dazu wurden die Proben je-

weils um den Faktor zehn verdünnt und zur Infektion frischer Zellkulturen (MDCK-Zellen) verwendet. Diese wurden für eine Stunde mit den einzelnen Verdünnungen infiziert und nach einem Waschschrift mit halbfestem Avicel-Medium überschichtet (Matrosovich et al., 2006). Dieser Ansatz wurde für 40 Stunden im Brutschrank inkubiert, anschließend das Überschichtungsmedium entfernt, die Zellen fixiert und die infizierten Zellen mittels Immunfärbung sichtbar gemacht. Das halbfeste Avicel-Medium verhindert, dass sich freigesetzte Viren über den Zellrasen ungehindert ausbreiten. So können einzelne, kreisförmige infizierte Bereiche im Zellrasen (sogenannte *plaque-forming-units*) ausgezählt werden. Über die Anzahl dieser *plaque-forming-units* wird die Zahl der infektiösen Viruspartikel pro Milliliter zu jedem Entnahmezeitpunkt und für jeden Inhibitor errechnet. Mittels dieser Methode kann der Einfluss der Inhibitoren auf die Bildung infektiöser Viren zeitabhängig untersucht werden.

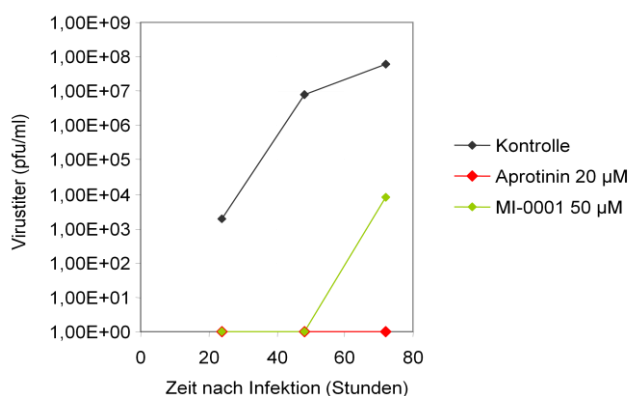


Abbildung 5.28 Hemmung der multizyklischen Vermehrung von Influenzaviren (A/Memphis/14/96 (H1N1)) in Calu-3 Zellen bei einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,0001.

Aus den so erhaltenen Wachstumskurven in Abbildung 5.28 ist zu erkennen, dass MI-0001 im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor die Virusvermehrung 1000-10000-fach hemmt. Der Referenzinhibitor Aprotinin in einer Konzentration von 20 µM ist deutlich stärker wirksam, so dass während des Versuchszeitraums keine infektiösen Viruspartikel mehr nachweisbar waren. Eine Ursache für die stärkere Wirkung des Aprotinins könnte darin liegen, dass Aprotinin ein sehr unspezifischer Proteasehemmstoff ist, der viele trypsinartige Serinproteasen sehr wirksam inhibiert (Ascenzi et al., 2003).

Die in den MDCK-HAT Zellen wirksamsten substratanalogen Inhibitoren besitzen neben der P1-Amidinobenzylamid-Struktur eine weitere basische Funktion in P3-Position.

Solche stark polaren, dibasischen Verbindungen sollten nur eine geringe Zellpermeabilität aufweisen. Allerdings gibt es mehrere Hinweise, dass die proteolytisch wirksame HAT vor allem auf der Oberfläche dieser Zellen exprimiert wird, womit sie auch für solche Inhibitoren zugänglich sein sollte (Böttcher-Friebertshäuser et al., 2010). Jedoch ist nicht auszuschließen, dass intrazellulär lokalisierte HAT oder andere trypsinartige Serinproteasen, wie die TMPRSS2 oder TMPRSS4, *in-vivo* an der HA-Prozessierung beteiligt sind. Für deren Hemmung wäre eine zelluläre Aufnahme der Inhibitoren nötig, was prinzipiell mit dem deutlich hydrophoberen Inhibitor MI-0335 eher möglich sein sollte. Neben dem P1-Amidinobenzylamid und dem N-terminalen Benzylsulfonylrest besitzt diese Verbindung ein hydrophobes, decanoyliertes Lysin in P2- und ein D-Cyclohexylalanin in P3-Position (Abbildung 5.29).

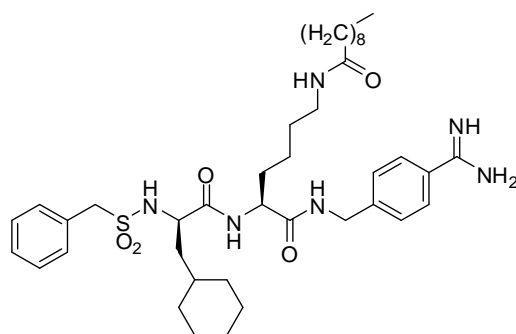


Abbildung 5.29 Strukturformel des hydrophoben Inhibitors MI-0335.

Neben den HAT-exprimierenden wurden auch TMPRSS2-exprimierende MDCK-Zellen für die Testung dieses Inhibitors verwendet. In den MDCK-HAT-Zellen zeigten die Inhibitoren MI-0001 und das decanoylierte Derivat MI-0335 eine ähnliche Wirksamkeit. In den TMPRSS2-exprimierenden Zellen hingegen hemmten die Inhibitoren MI-0001 und MI-0003 die Virusausbreitung kaum, während der hydrophobere Inhibitor MI-0335 eine signifikante Hemmung zeigte (Abbildung 5.30).

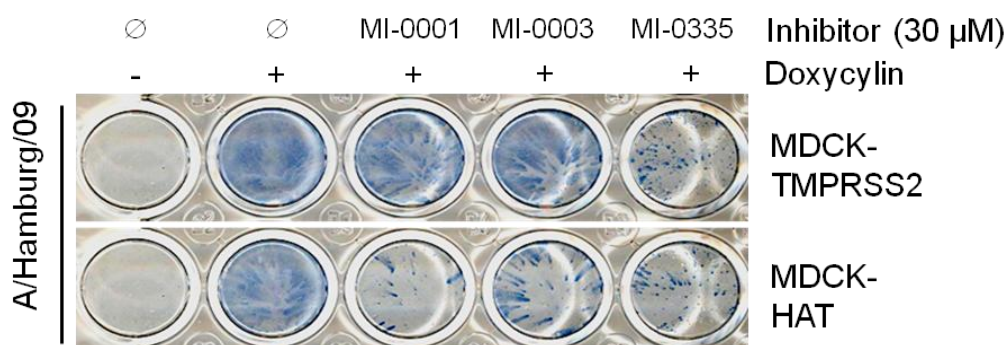


Abbildung 5.30 Vermehrung der Influenzaviren in MDCK-HAT- und MDCK-TMPRSS2-Zellen. Die MDCK-Zellen wurden mit dem Influenzavirus A/Hamburg/5/09 (H1N1) infiziert und mit den jeweiligen Inhibitoren inkubiert. Nach 24 Stunden wurden infizierte Zellen immunohistochemisch angefärbt (Böttcher-Friebertshäuser et al., 2010).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die auf der Zelloberfläche aktive HAT und dadurch die Virusvermehrung auch von den stark geladenen dibasischen Inhibitoren gehemmt werden kann, während die vor allem intrazellulär aktive TMPRSS2 von diesen Inhibitoren nicht erreicht wird. Eine bessere Aufnahme des hydrophoben, decanoylierten Inhibitors MI-0335 in die Zelle, könnte deshalb für die effektive Hemmung der TMPRSS2 verantwortlich sein. Obwohl es bereits mehrere Hinweise zur unterschiedlichen Lokalisation der HAT und TMPRSS2 gibt, ist sie bisher noch nicht endgültig geklärt (Böttcher-Friebertshäuser et al., 2010).

Neben den bisher untersuchten Verbindungen wurde mit MI-1074 der wirksamste Inhibitor aus der Piperazinserie (K_i -Wert 17 nM) zusätzlich zu den relativ selektiven Hemmstoffen MI-0380 und MI-0381 (K_i -Werte 14 nM bzw. 15 nM) auf die Hemmung der Virusausbreitung in MDCK-Zellen mit HAT-Expression getestet. Für diese Untersuchungen wurden das saisonale Influenzavirus A/Memphis/14/96 (H1N1) aus den vorherigen Untersuchungen und die pandemischen Influenzaviren A/Aichi/2/68 (H3N2) von 1968 und A/Hamburg/5/09 (H1N1) von 2009 verwendet. Die Verbindung MI-0001, die zuvor eine effektive Hemmung zeigte, wurde als Referenzinhibitor eingesetzt. Die Vermehrung der drei verwendeten Influenzaviren wurde von allen Inhibitoren mit einer Konzentration von 10 μ M stark gehemmt. Um eine quantitative Auswertung dieses Versuchs zu ermöglichen, wurden die infizierten Zellen gezählt und ihre Anzahl ins Verhältnis zu den inhibitorfreien Ansätzen (100 %) gesetzt. Aus diesen Werten wird ersichtlich, dass die Inhibitoren MI-1074 und MI-0381 sogar noch etwas wirksamer als die Referenzverbindung MI-0001 sind (Abbildung 5.31).

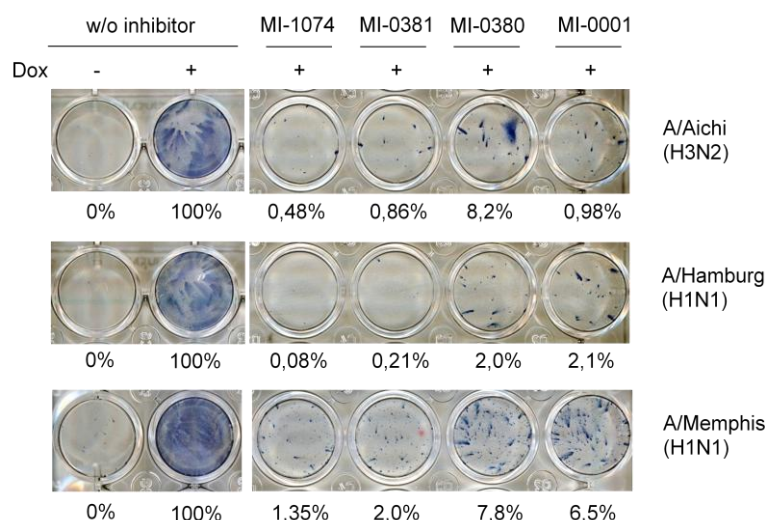


Abbildung 5.31 Vermehrung der Influenzaviren in MDCK-HAT-Zellen. Die MDCK-Zellen wurden mit Influenzaviren infiziert, mit den jeweiligen Inhibitoren (10 μ M) inkubiert und nach 24 Stunden immuno-histochemisch angefärbt. Die Zahl der infizierten Zellen wurde ausgezählt und prozentual in Relation zu den jeweiligen Ansätzen ohne Inhibitor (= 100 %) gesetzt.

Um auszuschließen, dass die Hemmwirkung durch zytotoxische Effekte der Inhibitoren verursacht wird, wurde der Einfluss der Verbindungen auf die Zellvitalität untersucht. Die mittels eines MTT-Tests (Mosmann, 1983) erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 5.32 dargestellt. Alle verwendeten Inhibitoren weisen nur marginale, zelltoxische Eigenschaften auf. Ein Abfallen der Zellvitalität bis auf 80 % wird im Allgemeinen als nicht kritisch angesehen. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis, dass die inhibitorische Wirkung der Verbindungen auf die Virusvermehrung vermutlich durch eine Hemmung der HAT bewirkt wird.

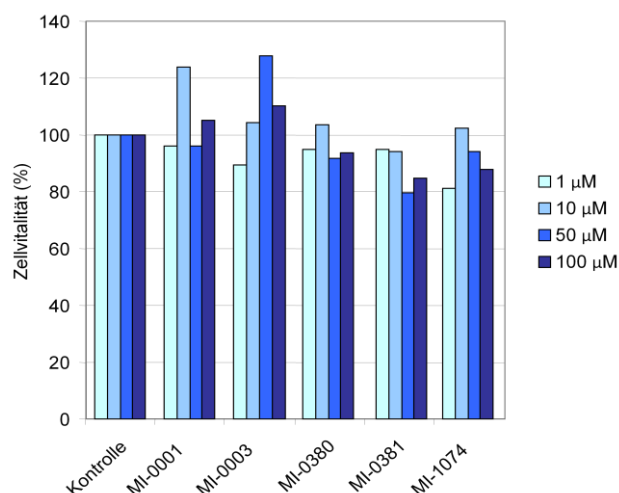


Abbildung 5.32 Ergebnisse des MTT-Tests zur Bestimmung der Zytotoxizität. Angegeben ist der prozentuale Anteil lebender Zellen im Vergleich zu Experimenten ohne Zusätze (Kontrolle). Wegen der hohen Schwankungsbreite der Ergebnisse wurde jeder Versuch mindestens dreimal durchgeführt.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Inhibitoren der hämagglutininspaltenden Proteasen Furin und HAT synthetisiert und charakterisiert. Während Furin das Hämagglutinin hochpathogener Influenzaviren vom Subtyp H5 und H7 aktiviert, bewirkt HAT die Spaltung des Hämagglutinins saisonaler Influenzaviren der Subtypen H1, H2, und H3. Die entwickelten Hemmstoffe dieser Proteasen könnten deshalb als Ausgangsstoffe für die Entwicklung neuer antiviraler Wirkstoffe zur Therapie der Influenza dienen.

6.1 Inhibitoren des Furins

Die bisher beschriebenen niedermolekularen Furininhibitoren sind meist stark basische Verbindungen. So zeigen z. B. die in unserem Arbeitskreis synthetisierten peptidischen Inhibitoren mit einem C-terminalen 4-Amidinobenzylamid hervorragende K_i -Werte; die wirksamste Verbindung hemmt Furin mit einem K_i -Wert von 8 pM (Becker, 2011). Allerdings ist derzeit noch unklar, ob solche stark basischen Inhibitoren aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften für eine Weiterentwicklung geeignet sind.

Deshalb wurde in einem *screening* nach potentiellen Startpunkten für die Entwicklung neuer niedermolekularer Inhibitoren mit verminderter Basizität gesucht und mit MI-0007 ein Bis-Amidinohydrazonderivat mit einem K_i -Wert von 1,8 μ M identifiziert. Prinzipiell sollten solche Amidinohydrazonverbindungen für eine Arzneistoffentwicklung geeignet sein, da mit Guanabenz eine strukturell verwandte Verbindung bereits als α_2 -Agonist angewendet wird. Der Vorteil der Amidinohydrazone im Vergleich zu Guanidinen und Amidinen liegt in ihrer reduzierten Basizität. Die berechneten und experimentell bestimmten pK_a -Werte derartiger Verbindungen liegen im Bereich von 8 bis 8,5.

Ausgehend von der Bis-Amidinohydrazonverbindung MI-0007 wurden in einer ersten Syntheserie kommerziell erhältliche Carbonylverbindungen und Säurechloride in die korrespondierenden Amidinohydrazone oder die acylierten Aminoguanidine überführt. Die acylierten Verbindungen waren alle deutlich weniger wirksamere Furininhibitoren als die Ausgangsverbindung MI-0007, so dass keine weiteren acylierten Aminoguanidine synthetisiert wurden. Auch die monovalenten Derivate des Acetophenons und

des Benzaldehyds haben keine messbare Affinität zu Furin. Die wirksamste Verbindung dieser Serie mit einem K_i -Wert von $1,5 \mu\text{M}$ ist das vom Terephthalaldehyd abgeleitete Bis-Amidinohydrazon (MI-0307).

Da aus zahlreichen Veröffentlichungen bekannt ist, dass sämtliche wirksamen Furininhibitoren mehrere basische Gruppierungen tragen, wurden in einer zweiten Serie Arginin oder guanylierte ω -Aminocarbonsäuren an die Anilinfunktion der Leitstruktur MI-0007 gekoppelt. Allerdings ist die Argininverbindung MI-0039 mit einer Hemmkonstante von $1,1 \mu\text{M}$ nur wenig wirksamer als die Leitstruktur mit freiem Anilin ($K_i = 1,8 \mu\text{M}$). Durch die Kopplung von 4-Aminobuttersäure und nachfolgende Guanylierung wurde mit Inhibitor MI-0036 die wirksamste Verbindung dieser Serie mit einem K_i -Wert von $0,5 \mu\text{M}$ erhalten.

Durch Dimerisierung wurden in einem dritten Syntheszyklus Verbindungen mit bis zu vier Amidinohydrazonfunktionen dargestellt. Dazu wurden die Ausgangsverbindung MI-0007 oder analoge Phenol- und Anilinderivate mit Malonsäure oder Chloressigsäurechlorid dimerisiert. Jedoch konnte keine Korrelation der Anzahl basischer Funktionen mit der Hemmkonstanten festgestellt werden, obwohl die wirksamste Verbindung der Serie MI-0342 vier basische Amidinohydrazongruppen trägt ($K_i = 0,6 \mu\text{M}$).

Die Untersuchungen deuteten darauf hin, dass mindestens zwei Amidinohydrazongruppen für eine Grundaffinität zum Furin nötig sind, jedoch wurde in der Literatur auch ein monovalentes Derivat mit einem K_i -Wert von $11,8 \mu\text{M}$ beschrieben (Komiyama et al., 2009). Dieser Inhibitor MI-0359 wurde als Referenz nachsynthetisiert und ein vergleichbarer K_i -Wert von $26 \mu\text{M}$ für Furin bestimmt. Neben der Amidinohydrazonfunktion ist das 2-Hydroxybenzaldehyd-Grundgerüst dieses Inhibitors mit einem *para*-Chlorbenzylether substituiert. Da dieser offenbar beträchtlichen Einfluss auf die Affinität zu Furin hat, wurden in einer vierten Inhibitorserie weitere Analoga mit verschiedenen substituierten Benzylethern synthetisiert, die sich allerdings als weniger wirksam als die bekannte Referenzverbindung MI-0359 erwiesen.

Da keine Kristallstruktur des Furins im Komplex mit den Amidinohydrazoninhibitoren gelöst werden konnte, wurden mittels Docking mögliche Bindungsmodi der synthetisierten Verbindungen bestimmt. Für das vom Isophthalaldehyd abgeleitete Bis-Amidinohydrazonderivat MI-0356 wurde eine sinnvolle Dockinglösung gefunden, in der eine Amidinohydrazonfunktion die S1- und die andere die S2-Tasche besetzt. Eine

Überlagerung mit dem irreversiblen Inhibitor Dec-RVKR-CMK aus der Kristallstruktur zeigt, dass dessen P1-Guanidinogruppe am Boden der S1-Tasche eine sehr ähnliche Position besetzt, wie sie auch für die Amidinohydrazongruppe mittels Docking gefunden wurde. Diese kann somit analoge Wechselwirkungen zu den Seitenketten von Asp258 und Asp306 sowie zu dem Carbonylsauerstoff von Ala292 ausbilden. Die moderat basische Amidinohydrazongruppe ist also prinzipiell geeignet, die stark basischen Guanidinoester in P1-Position von Furininhibitoren zu ersetzen. Ohne eine experimentelle Bestimmung des Bindungsmodus mittels Röntgenstrukturanalyse ist es jedoch unmöglich festzustellen, warum nur eine moderate Verbesserung der Hemmwirkung innerhalb dieser Verbindungsklasse im Vergleich zur Leitstruktur MI-0007 erreicht werden konnte.

Mit Ausnahme der Verbindung MI-0342 weisen alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Amidinohydrazonderivate eine hohe Selektivität gegenüber den untersuchten trypsinartigen Serinproteasen Thrombin, Faktor Xa und Plasmin auf (K_i -Werte $> 30 \mu\text{M}$). Lediglich Thrombin wird von dem Inhibitor MI-0342 mit einem K_i -Wert von $0,9 \mu\text{M}$ stärker gehemmt. Auch gegenüber bakteriellem Subtilisin weisen die Verbindungen eine hohe Selektivität auf, so dass nur prozentuale Hemmraten von unter 8 % bei einer Inhibitorkonzentration von $80 \mu\text{M}$ bestimmt werden konnten.

Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen wurden mittels verschiedener Synthesestrategien Amidinohydrazoninhibitoren für Furin synthetisiert. Die Verbesserung ihrer Hemmwirkung gelang jedoch nur in moderatem Umfang, die wirksamste Verbindung inhibiert Furin mit einem K_i -Wert von $0,5 \mu\text{M}$. Ohne gesichertes Kenntnis des Bindungsmodus ist es derzeit schwierig, die Hemmwirkung innerhalb dieser Verbindungsklasse gezielt zu verbessern.

6.2 Inhibitoren der HAT

Für die trypsinartige Serinprotease HAT wurden bisher nur wenige Inhibitoren in der Literatur beschrieben. Deshalb begannen die Arbeiten zur Entwicklung der HAT-Inhibitoren mit einem *screening* verfügbarer Verbindungen. Neben substratanalogen Inhibitoren mit einem C-terminalen 4-Amidinobenzylamid konnten Verbindungen mit einem zentralen 3-Amidinophenylalanin des TAPAP-Typs als Startpunkte für die Entwicklung von HAT-Hemmstoffen identifiziert werden.

Bei den substratanalogen Inhibitoren wurde in P4-Position standardmäßig ein Benzylsulfonylrest und in P1-Position, abgesehen von zwei Ausnahmen, 4-Amidinobenzylamid eingebaut. Die Inhibitoren MI-0373 und MI-0374 mit *meta*-chlorsubstituierten Benzylamiden in P1-Position erwiesen sich als unwirksam.

Untersucht wurden der Einfluss verschiedener D-konfigurierter Aminosäuren in P3- und verschiedener L-Aminosäuren in P2-Position. In Kombination mit einem P2-Prolin wurden in P3-Position verschiedene D-Aminosäurereste akzeptiert, besonders die basischen Aminosäuren D-Arg und D-*homo*-Arg mit Hemmkonstanten von 19 und 13 nM. Aber auch hydrophobe Aminosäurederivate wie ein *tert.*-butyl-geschütztes D-Asp oder D-Glu hemmen HAT mit Hemmkonstanten < 40 nM. Im Gegensatz dazu ist der Einbau des sauren Aspartylrestes in P3-Position ungünstig (K_i -Wert = 1,4 μ M). Die meisten anderen Inhibitoren dieser Serie hemmen HAT mit Hemmkonstanten unter 300 nM.

Aufgrund der Präferenz für basische und auch für hydrophobe Aminosäurereste in P3-Position, wurden die Seitenketten von D-Asp und D-Glu in einer zweiten Syntheserie mit verschiedenen zyklischen Aminen modifiziert. Dadurch war es möglich, auf einfache Weise eine weitere Serie mit basischen oder hydrophoben P3-Resten darzustellen. Die Wirkstärke dieser Inhibitoren liegt in der gleichen Größenordnung, wie die der vorangegangenen Serie. Die wirksamste Verbindung MI-1074 hat einen K_i -Wert von 17 nM und wurde durch Kopplung von 1-(2-Pyrimidyl)piperazin an die Seitenkette von D-Glu erhalten.

Substratanaloge Inhibitoren mit einem P2-Prolin sind bereits als potente Inhibitoren anderer trypsinartiger Serinproteasen bekannt. Da diese Verbindungen häufig eine geringe Selektivität besitzen, wurde dieses P2-Prolin durch andere Aminosäuren ausgetauscht, wobei D-Arg in P3-Position beibehalten wurde. Die stärkste Hemmwirkung innerhalb dieser Serie mit K_i -Werten < 30 nM wurde für kleine hydrophobe Aminosäuren, wie Abu, Nva, Val oder Ala gefunden. Im Gegensatz dazu führte der Einbau eines basischen Arginins oder eines sterisch anspruchsvollen *tert.*-butyl-geschützten Asparaginsäurerestes zu weniger wirksamen Verbindungen.

Ein entscheidender Vorteil der Derivate mit Abu oder Nva in P2-Position ist ihre erhöhte Selektivität gegenüber den Proteasen Thrombin, Faktor Xa und Plasmin, da die Verbindungen mit einem Prolin in P2-Position diese Proteasen zum Teil sogar stärker als ihr eigentliches Zielenzym HAT hemmen. Die Verbindung Bzls-D-Arg-Nva-AMBA ist

mit einer Hemmkonstanten von 15 nM der erste Inhibitor, der die anderen getesteten Proteasen schwächer hemmt und somit die höchste Selektivität für HAT aufweist.

Auch die in P3-Position mit zyklischen Aminen modifizierten D-Asp- und D-Glu-Derivate weisen zum Teil eine starke Hemmwirkung gegenüber der HAT und gleichzeitig eine gewisse Selektivität gegenüber Thrombin, Faktor Xa und Plasmin auf. Deshalb könnten diese Strukturen für die weitere Entwicklung potentieller Hemmstoffen dienen, indem sie mit Abu oder Nva in P2-Position kombiniert werden.

Ausgewählte Verbindungen wurden in Zellkulturversuchen eingesetzt und auf die Fähigkeit, die Vermehrung von Influenzaviren zu hemmen, untersucht. In den verwendeten HAT-exprimierenden MDCK-Zellen zeigten besonders die Inhibitoren mit Nva oder Abu in P2-Position eine stärkere Wirksamkeit als der Referenzinhibitor MI-0001. Neben der Hemmung von Influenzaviren mit einem Hämagglutinin vom Subtyp H1 war es auch möglich, Stämme mit Hämagglutinin des Subtyps H3 zu hemmen. Dies könnte ein wichtiger Vorteil dieser Wirkstoffklasse sein, da viele Wirkstoffe, die gegen virale *targets* gerichtet sind, häufig nur die Vermehrung einzelner Virussubtypen hemmen. Die Inhibitoren weisen darüber hinaus keine signifikante Zytotoxizität auf, so dass die reduzierte Virusausbreitung sehr wahrscheinlich auf die Hemmung der HAT und die damit verbundene verminderte HA-Aktivierung zurückzuführen ist.

Die synthetisierten Verbindungen vom TAPAP-Typ hemmen HAT im Vergleich zu den substratanalogen Inhibitoren weniger stark. Diese Grundstruktur bietet durch Modifikation der C- und der N-terminalen Reste jedoch noch zahlreiche Möglichkeiten, um wirksamere Hemmstoffe der HAT zu entwickeln. Die von Thrombinhemmstoffen abgeleiteten Inhibitoren mit einem Amidrazon in *para*-Position des Phenylalanins waren gegenüber HAT allerdings inaktiv. Offenbar kann mit diesem Strukturmotiv die S1-Tasche der HAT, im Gegensatz zum Thrombin, nicht besetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche substratanaloge Inhibitoren identifiziert, die HAT mit K_i -Werten < 30 nM wirksam hemmen. Diese Verbindungen haben sich auch in verschiedenen Zellkulturuntersuchungen als wirksam erwiesen und die Vermehrung verschiedener Influenzastämme mit Hämagglutinin der Subtypen H1 und H3 deutlich reduziert. Für solche stark basischen Benzamidinderivate wurden außerdem verschiedene Prodrugstrategien entwickelt, wie z. B. bei den Arzneistoffen Dabigatran oder Ximelagatran (Hauel et al., 2002; Gustafsson et al., 2004). Möglicherweise könnten

einige Derivate für erste Experimente im Tiermodell geeignet sein. Da das Wirkprinzip auf zellulärer Ebene bewiesen ist, sollte in zukünftigen Arbeiten das Selektivitätsprofil und die Bioverfügbarkeit dieser Verbindungen verbessert werden, damit diese eventuell als Arzneistoffkandidaten in Betracht gezogen werden können.

7 Experimenteller Teil

7.1 Material und Methoden

7.1.1 Verwendete Materialien

Die verwendeten Lösungsmittel wurden von den Firmen Acros, VWR, Fisher Scientific, Fluka oder Sigma-Aldrich bezogen. Lösungsmittel zum Waschen von Ansätzen stammte aus Hochschullieferungen, das benutzte DMF hatte die Bezeichnung „für die HPLC“. Trockene Lösungsmittel wurden durch Lagerung über geeignetem Molsieb oder im Falle von Diethylether und THF durch Lagerung und Destillation über Natrium hergestellt. Für die analytische und präparative HPLC wurde Acetonitril der Firmen VWR (HiPerSolv CHROMANORM) und Sigma-Aldrich (CHROMASOLV for HPLC) sowie Reinstwasser verwendet. Das Reinstwasser wurde mit einer NOWApure select Anlage (KSN Wassertechnik, Nistertal) erhalten. Wässrige Lösungen von Säuren, Basen oder Salzen wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Trifluoressigsäure stammte aus Hochschullieferungen der Firma Solvay. Standardchemikalien wurden von den Firmen Acros, Sigma-Aldrich, Fluka, Fisher, VWR und Roth bezogen, bei Ausnahmen ist der Hersteller gesondert angegeben. Aminosäuren und deren Derivate sowie Koppelungsreagenzien stammen von den Firmen Bachem, Novabiochem, IRIS Biotech, ORPEGEN Peptide Chemicals, PolyPeptide und Senn Chemicals.

7.1.2 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Fertigplatten „Aluminiumoxid 60 F₂₅₄ neutral“ der Firma Merck und als Laufmittel ein Gemisch aus n-Butanol, Eisessig und Wasser (4:1:1) verwendet. Die Detektion der Verbindungen erfolgte durch UV-Absorption bei 254 nm. Außerdem wurden die DC-Platten mit Ninhydrinsprühareagenz (300 mg Ninhydrin gelöst in 100 mL n-Butanol und 3 mL Eisessig) angefärbt. Die angegebenen R_F-Werte beschreiben das Verhältnis der Laufstrecke der Probe zur Laufmittelfront.

7.1.3 HPLC und Lyophilisierung

Für sämtliche HPLC-Untersuchungen wurden Reinstwasser mit 0,1 % TFA (A) und Acetonitril mit 0,1 % TFA (B) als Laufmittel verwendet. Die Detektion erfolgte bei 220 nm. Zur Charakterisierung der Verbindungen wird die Acetonitrilkonzentration, bei der die betreffende Verbindung eluiert als % B angegeben.

HPLC 1:

Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden alle analytischen HPLC-Chromatogramme an einer Anlage LC-10A der Firma Shimadzu, bestehend aus den Teilsystemen CTO-10A Säulenofen, DGU-14A Degasser, SIL-10Axl Autoinjektor, zwei LC-10ATvP-Pumpen, SCL-10AvP System Controller und einem SPD-M10AvP Dioden-Array-Detektor aufgenommen (Säule: Nucleodur 5 μ M C-18ec, 100 Å, 250 \times 4,6 mm der Firma Macherey-Nagel). Die Chromatogramme wurden mit einem linearen Gradienten von 1 % B/min und einer Flussrate von 1 mL/min bei unterschiedlichen Startbedingungen (1, 10, 20, 30 und 40 % B) entwickelt.

HPLC 2:

Einige analytische HPLC-Chromatogramme wurden zur Reaktionskontrolle und zur Charakterisierung von Zwischenprodukten auf einer Anlage LC-10A der Firma Shimadzu, bestehend aus den Teilsystemen CTO-10A Säulenofen, zwei LC-10AS Pumpen, SCL-10AvP System Controller und einem SPD-M10A UV-Vis-Detektor aufgenommen (Säule: Chromolith Performance 2 μ M C-18 endcapped, 130 Å, 100 \times 4,6 mm der Firma Merck). Die Chromatogramme wurden mit einem linearen Gradienten 10 % B/min und einer Flussrate von 4 mL/min, beginnend bei 1 % B, entwickelt. Zur Unterscheidung werden die Angaben in den Versuchsbeschreibungen mit „HPLC 2“ gekennzeichnet.

Präparative HPLC:

Für präparative HPLC-Reinigungen wurde eine Anlage, bestehend aus zwei Varian PrepStar-Pumpen, Modell 218, einem ProStar Detektor, Modell 320, und einem Varian Fraktionskollektor, Modell 701, verwendet. Als Säulen dienten:

Nucleodur 100-5 C8ec, 100 Å, der Firma Macherey-Nagel

Nucleosil 300-5 C18, 300 Å, der Firma Macherey-Nagel

Prontosil 120-5-C18-SH, 120 Å, der Firma Bischoff Chromatography

mit den Abmessungen 250×32 mm. Verwendet wurde ein geeigneter, linearer Gradient mit einer Flussrate von 20 mL/min.

7.1.4 Lyophilisierung

Zur Gefriertrocknung wurden die synthetisierten Verbindungen in 80 % *tert.*-Butanol in demineralisiertem Wasser oder in reinem demineralisiertem Wasser an einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LDplus (Christ, Osterode am Harz) lyophilisiert.

7.1.5 NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie

Die ^1H - und ^{13}C -Spektren wurden an einem Jeol-ECX-400 (Jeol Inc., USA) bei 400,0 bzw. 100,6 MHz aufgenommen und durch Zugabe von TMS referenziert; die chemische Verschiebung wurde in ppm angegeben. Die molekulare Masse der synthetisierten Verbindungen wurde mit einem QTrap 2000 ESI Massenspektrometer (Applied Biosystems, USA) oder einem VG-Autospec (Micromass, USA) bestimmt.

7.2 Enzymkinetische Messungen unter Verwendung von AMC-Substraten

7.2.1 Allgemeines

Die Bestimmung der Hemmkonstanten der synthetisierten Verbindungen wurde auf FluoroNunc F96 MaxiSorp-Platten der Firma Nunc (Langenselbold) mit einem Fluoreszenzplattenleser Tecan Safire² (Tecan, Schweiz) durchgeführt. Als Substrate wurden Peptide mit dem Fluorophor 7-Amino-4-methylcoumarin verwendet ($\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm). Auf jeder 96-*well*-Platte wurden, neben den Messungen in Gegenwart der Inhibitoren, die enzymkinetischen Parameter K_{m} und V_{max} bestimmt.

Von den Verbindungen wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mM oder 100 mM in DMSO hergestellt. Die Konzentration der Inhibitoren im Messansatz war mindestens 10-fach höher als die Enzymkonzentration und wurde über mindestens eine Größenordnung variiert. Bei der Berechnung der Molekulargewichte wurde für jede basische Gruppe und für jede Amidinohydrazongruppe ein Molekül TFA addiert.

Der allgemeine Messansatz ist in Tabelle 7.1 zusammengestellt. Die Messungen wurden durch Zugabe des Enzyms gestartet.

Tabelle 7.1 Allgemeiner Messansatz zur Bestimmung der Hemmkonstanten mit AMC-Substraten.

Volumen (µL)	Reagenz
2	Inhibitor in DMSO
160	Puffer
20	Substrat in 50 % DMSO oder Wasser
20	Enzymlösung in Puffer
202	Gesamtvolumen

Aus den erhaltenen Zeit-Umsatz-Kurven wurden durch lineare Regression die *steady-state*-Geschwindigkeiten v bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden mittels Gleichung 1 angepasst und die K_i -Werte berechnet.

Gleichung 1 Gleichung für eine reversible-kompetitive Enzymhemmung. (v : Geschwindigkeit der Enzymreaktion; V_{\max} : Maximalgeschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion; S : Substratkonzentration; K_m : Michaelis-Menten-Konstante; I : Inhibitorkonzentration; K_i : Inhibitionskonstante)

$$(1) \quad v = \frac{V_{\max} \times S}{K_m \times \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}$$

Die errechneten K_i -Werte entsprechen den Mittelwerten aus mindestens zwei unabhängigen Bestimmungen.

7.2.2 Bestimmung der Hemmkonstanten für Furin

Die Hemmkonstanten wurden mit rekombinantem, humanem Furin (Kacprzak et al., 2004) in 100 mM HEPES Puffer pH 7,0 mit 0,2 % Triton X-100, 2 mM CaCl_2 , 0,02 % Natriumazid und 1 mg/mL BSA durchgeführt (Becker et al., 2010). Als Substrat wurde pyroGlu-RTKR-AMC (Bachem, Weil am Rhein) mit den Konzentrationen 3,25, 13 und 35,5 µM verwendet. Die Enzymkonzentration im Messansatz betrug 0,95 nM, basierend auf der Bestimmung des Proteingehalts bei einem Molekulargewicht von 70 kDa (Informationen von Iris Lindberg).

7.2.3 Bestimmung der Hemmkonstanten für HAT

Für die enzymkinetischen Messungen wurde eine verkürzte Variante der *human airway trypsin-like protease* (R&D Systems, Wiesbaden; Katalog Nummer 2695-SE) in 50 mM Tris Puffer pH 9,5 mit 0,05 % Brij 58 und 1 mg/mL BSA verwendet. Als Substrat wur-

de H-D-Cha-Pro-Arg-AMC mit den Konzentrationen 50, 100 und 200 μM verwendet, das im Arbeitskreis synthetisiert wurde. Die Enzymkonzentration wurde mit dem vom Hersteller angegebenen Molekulargewicht von 42 kDa berechnet und betrug 23,8 pM im Messansatz.

7.2.4 Screening der Inhibitoren mit HAT

Für das initiale Inhibitorscreening wurde das Substrat H-D-Cha-Pro-Arg-AMC in einer Konzentration von 100 μM verwendet. Von den Inhibitoren wurde eine Verdünnungsreihe im Bereich von 10 mM bis 10 μM über vier Schritte eingesetzt. Die Steigungen der erhaltenen Zeit-Umsatz-Kurven wurden als Funktion der Inhibitorkonzentration aufgetragen und der K_i -Wert nach Gleichung 1 berechnet.

7.3 Enzymkinetische Messungen unter Verwendung von pNA-Substraten

7.3.1 Bestimmung der Hemmkonstanten für Thrombin, FXa und Plasmin

Die Bestimmung der Hemmkonstanten für Thrombin, FXa und Plasmin erfolgte in 50 mM Tris Puffer pH 8,0 mit 0,9 % NaCl und 5 % Ethanol unter Verwendung geeigneter pNA-Substrate bei 405 nm. Der allgemeine Messansatz ist in Tabelle 7.2 zusammengestellt. Die Messungen wurden durch Zugabe des Enzyms gestartet, nach fünf bis zehn Minuten durch Hinzufügen von 25 μL 50 % Essigsäure beendet und die Absorption bestimmt (Stürzebecher et al., 1997).

Tabelle 7.2 Allgemeiner Messansatz zur Bestimmung der Hemmkonstanten mit pNA-Substraten.

Volumen (μL)	Reagenz
200	Inhibitor in Messpuffer
25	Substrat in Wasser
50	Enzymlösung in Puffer
275	Gesamtvolumen

Die K_i -Werte wurden nach der Methode von Dixon bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen und vier verschiedenen Inhibitorkonzentrationen mittels eines Computerprogramms bestimmt (Dixon, 1953). Die verwendeten Substrate wurden in unserem Arbeitskreis synthetisiert, sind jedoch auch kommerziell erhältlich.

Thrombin (bovin)

Enzymkonzentration im Ansatz: $6,77 \times 10^{-10}$ M

Substrat: MeSO₂-D-Cha-Gly-Arg-pNA; Konzentration: 2, 1 und 0,5 mM

Faktor Xa (human)

Enzymkonzentration im Ansatz: $4,94 \times 10^{-10}$ M

Substrat: CH₃OCO-D-Cha-Gly-Arg-pNA; Konzentration: 2, 1 und 0,5 mM

Plasmin (human) (Chromogenix, Lexington, USA)

Enzymkonzentration im Ansatz: $2,24 \times 10^{-9}$ M

Substrat: Tos-Gly-Pro-Lys-pNA; Konzentration: 2, 1 und 0,5 mM

7.3.2 Bestimmung der prozentualen Hemmung von Subtilisin

Subtilisin aus *Bacillus licheniformis* (Sigma Aldrich, München; Katalog Nummer P5380) wurde in einer finalen Konzentration von 0,92 nM eingesetzt. Die Bestimmungen erfolgten in 50 mM Tris Puffer pH 7,5 mit 1 M NaCl und 0,01 % Triton X-100 unter Verwendung von Succinoyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Bachem, Weil am Rhein) als Substrat bei 405 nm. Das Substrat wurde in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 1 mM verwendet. Von den Inhibitoren wurden Lösungen in Messpuffer mit einer Konzentration von 100 µM hergestellt.

Zu 160 µL Inhibitorlösung wurden 20 µL Substratlösung gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 20 µL Enzymlösung gestartet. Außerdem wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt, indem statt der Inhibitorlösung 160 µL Messpuffer verwendet wurden. Durch lineare Regression wurden die *steady-state*-Geschwindigkeiten der einzelnen Enzymreaktionen berechnet. Aus den bestimmten Geschwindigkeiten in Gegenwart und Abwesenheit des Inhibitors wurde die prozentuale Hemmung der Inhibitoren bestimmt.

7.4 Allgemeine Synthesevorschriften

Zu Beginn sind allgemeine Synthesevorschriften aufgeführt, die in den folgenden Abschnitten wiederholt verwendet werden.

Vorschrift A:

Alkylierung von Phenolen mit Benzylbromidderivaten (Lin et al., 2005)

Das entsprechende Phenol wurde mit jeweils 1,5 Äquivalenten Kaliumiodid und wasserfreiem Kaliumcarbonat in destilliertem THF (6 mL/mmol Phenol) suspendiert. Zu der Suspension wurden 1,3 Äquivalente des entsprechenden Benzylbromids gegeben und der Ansatz unter Rückfluss für ca. sechs Stunden erhitzt. Die Umsetzung wurde mit HPLC überprüft; bei unvollständiger Reaktion wurden weitere 0,5 Äquivalente des Benzylbromids hinzugegeben und zusätzliche drei Stunden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Es wurde dreimal mit 5 % KHSO_4 -Lösung, dreimal mit ges. NaHCO_3 -Lösung und zweimal mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Vorschrift B:

Umwandlung von Carbonylgruppen in Amidinohydrazone (Ulrich and Cerami, 1984)

Die Carbonylverbindungen wurden in 50 % Ethanol (2 mL/mmol) gelöst bzw. suspendiert und der Ansatz auf 80 °C erhitzt. Zu dem Ansatz wurde Aminoguanidin \times HCl (1,3 Äquivalente pro mmol Carbonylverbindung) und 5 mol% Salzsäure gegeben. Es wurde unter Rückfluss für sechs Stunden erhitzt und die Umsetzung mit HPLC überprüft. Bei unvollständiger Reaktion wurde Aminoguanidin \times HCl nachdosiert und weitere sechs Stunden unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift C:

PyBOP-Kopplung (Frerot et al., 1991)

Die Aminokomponente wurde zusammen mit einem Äquivalent der Carboxylkomponente in DMF gelöst. Nach Zugabe von 1,05 Äquivalenten PyBOP wurde der pH-Wert mit DIPEA (zwei bis drei Äquivalente) auf pH 8-9 eingestellt, 20 Minuten bei 0 °C und anschließend weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt direkt präparativ über HPLC aufgereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert. Alternativ wurde der Rückstand in EtOAc aufgenommen, zweimal mit 5 % KHSO₄-Lösung, zweimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Vorschrift D:

HBTU-Kopplung

Die Aminokomponente wurde zusammen mit einem Äquivalent der Carboxylkomponente in DMF gelöst. Nach Zugabe von 1,1 Äquivalenten HBTU und HOBT wurde der pH-Wert mit DIPEA auf pH 8-9 eingestellt und 30 Minuten bei 0 °C gerührt, anschließend weitere zehn Stunden bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, das Produkt präparativ über HPLC aufgereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift E:

Mischanhydridverfahren

Die entsprechende Carboxylkomponente wurde in DMF gelöst (5 mL/mmol). Unter Rühren wurden jeweils 1 Äquivalent N-Methylmorpholin und Chlorkohlensäureisobutylester bei -15 °C zugegeben. Das Salz der Aminokomponente (1 Äquivalent) wurde in ca. 5 mL DMF suspendiert und mit einem bis zwei Äquivalenten N-Methylmorpholin versetzt. Diese Suspension wurde nach 15 Minuten zu der Lösung der Carboxylkomponente gegeben und für eine Stunde bei -15 °C, dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

*Vorschrift F:***Umwandlung von Säurechloriden in acylierte Aminoguanidine (Bignon, 2002)**

Pro mmol Säurechlorid wurden 1,3 Äquivalente Aminoguanidin \times HCO_3^- in wasserfreiem Pyridin suspendiert. Unter Eiskühlung wurde das entsprechende Säurechlorid portionsweise zugegeben und der Ansatz zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand mit 20 mL 1 N Natronlauge versetzt. Der erhaltene Niederschlag wurde durch Filtration isoliert, mehrfach mit wenig Eiswasser gewaschen und im Feinvakuum getrocknet.

*Vorschrift G:***Einführung der Benzylsulfonylgruppen nach Silylierung (Schwarz et al., 1981)**

Die entsprechende Aminosäure wurde in trockenem DCM suspendiert (7 mL/mmol) und mit 2,2 Äquivalenten Trimethylsilylchlorid und 2,2 Äquivalenten DIPEA versetzt. Der Ansatz wurde für eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen im Eisbad wurden 1,1 Äquivalente Benzylsulfonylchlorid und 1,1 Äquivalente DIPEA zugegeben und der Ansatz 15 Minuten bei 0 °C, anschließend drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase (pH > 10) wurde zweimal mit wenig EtOAc gewaschen, dann mit HCl (pH 2-3) angesäuert. Das Produkt wurde dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten EtOAc-Phasen wurden mit 5 % KHSO_4 -Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

*Vorschrift H:***Abspaltung von Boc- und tBu-Schutzgruppen mit 90 % TFA**

Die Boc- oder tBu-geschützte Verbindung wurde in 90 % TFA (5 mL/mmol) gelöst, für eine bis drei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und gelegentlich umgeschüttelt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig Methanol angelöst und das Produkt in Diethylether gefällt. Alternativ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

Vorschrift I:

Verseifung der Methylester mit 1 M NaOH

Der entsprechende Ester wurde in einer Mischung aus 1,4-Dioxan und Wasser (1:1; 10 mL/mmol Ester) gelöst. Es wurde 1 M NaOH zugegeben bis pH 12 erreicht wurde und in der Regel drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde mit TFA neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift J:

Synthese der Hydroxyamidine (Stüber et al., 1995)

Das entsprechende Nitril wurde mit zwei Äquivalenten Hydroxylamin \times HCl und zwei Äquivalenten DIPEA in absolutem Ethanol (5 mL/mmol Nitril) gelöst und unter Rückfluss für fünf Stunden erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und dreimal mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Vorschrift K:

Darstellung der Amidine aus den Hydroxyamidinen (Judkins et al., 1996)

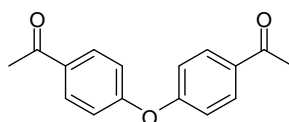
Die Hydroxyamidino-Verbindung wurde in Essigsäure (10 mL/mmol) gelöst, mit drei Äquivalenten Acetanhydrid versetzt und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Reaktionslösung wurde 90 % Essigsäure und 10 mol% Pd/C als Katalysator gegeben. Der Ansatz wurde unter H₂-Atmosphäre für mindestens zwölf Stunden bei Raumtemperatur hydriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

7.5 Synthese der Vorstufen

In diesem Teil sind die Synthesen für die Grundbausteine der Inhibitoren beschrieben. Bei Bedarf wurden Nachsynthesen in größerem Maßstab durchgeführt, die nicht gesondert aufgeführt sind. Da bei einigen Vorstufen auf eine Aufreinigung verzichtet wurde und die Rohprodukte noch Salze enthielten, wird bei diesen keine prozentuale Ausbeute angegeben.

7.5.1 Vorstufen für Inhibitoren mit Amidinohydrazongruppen

1) 4,4'-Diacetyldiphenylether



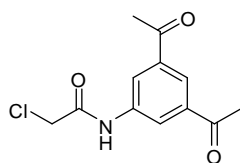
0,5 g (2,93 mmol) Diphenylether und 0,62 mL (8,81 mmol) Acetylchlorid wurden in 20 mL trockenem DCM gelöst. Unter Eiskühlung wurden portionsweise 1,5 g (11,46 mmol) Aluminiumchlorid hinzugegeben und der Ansatz für zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt, dann für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde auf Eis gegossen und dreimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit 5 % KHSO_4 -Lösung, dreimal mit ges. NaHCO_3 -Lösung und dreimal mit ges. NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 0,74 g (99,7 % der Theorie), gelber Feststoff.

HPLC: 48,9 % B; MS ber.: 254,09, MS gef.: 254,98 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

¹H-NMR: 400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ [ppm] = 2,18 (s, 6 H), 6,92-7,87 (2d, 8 H, aromatisch).

2) 2-Chloro-N-(3,5-diacetylphenyl)acetamid (Baraldi et al., 2007)

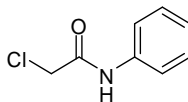


0,4 g (2,25 mmol) 3,5-Diacetylanilin (Ulrich and Cerami, 1984) und 0,37 g (2,70 mmol) wasserfreies Kaliumcarbonat wurden in 10 mL trockenem DCM suspendiert. Zu der Suspension wurden langsam 0,21 mL (2,63 mmol) Chloracetylchlorid gegeben und fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wurde auf Eis gegossen und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit ges. NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 0,53 g (93,8 % der Theorie), bräunlicher Feststoff.

HPLC: 37,5 % B; MS ber.: 253,05, MS gef.: 253,99 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

3) 2-Chloro-*N*-phenylacetamid (Baraldi et al., 2007)

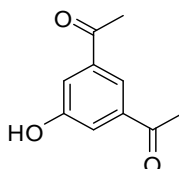


0,4 g (4,29 mmol) Anilin und 0,71 g (5,14 mmol) wasserfreies Kaliumcarbonat wurden in 10 mL trockenem DCM suspendiert. Zu der Suspension wurden langsam 0,4 mL (5,0 mmol) Chloracetylchlorid gegeben und fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wurde auf Eis gegossen und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 0,73 g (99,7 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 38,7 % B; MS ber.: 169,03, MS gef.: 170,01 (M+H)⁺.

4) 3,5-Diacetylphenol (Ulrich and Cerami, 1984)

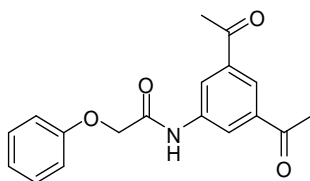


0,1 g (0,56 mmol) 3,5-Diacetylanilin (Ulrich and Cerami, 1984) wurden in 1,5 mL Schwefelsäure (3 %) gelöst und unter Eiskühlung mit 43 mg (0,62 mmol) NaNO₂ versetzt. Nach 30 Minuten wurden 10 mg Harnstoff hinzugefügt und für eine Stunde auf 80 °C erwärmt. Der Ansatz wurde mit ges. NaCl-Lösung verdünnt und das Produkt dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 74 mg (73,5 % der Theorie), orangener Feststoff.

HPLC: 33,4 % B; MS ber.: 178,06, MS gef.: 177,15 (M-H)⁻.

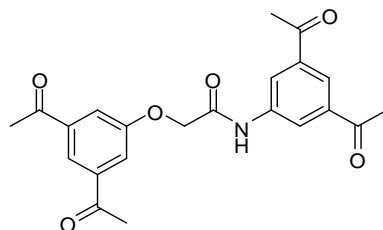
5) *N*-(3,5-Diacetylphenyl)-2-phenoxyacetamid



0,1 g (0,39 mmol) des Intermediats **2**, 74 mg (0,79 mmol) Phenol und 0,25 g (0,76 mmol) Cs₂CO₃ wurden in 10 mL ACN suspendiert und fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der verbleibende Feststoff in Wasser aufgenommen. Das Produkt wurde dreimal mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen dreimal mit ges. NaHCO₃-Lösung und dreimal mit 5 % KHSO₄-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 0,12 g (99,8 % der Theorie), brauner Feststoff.

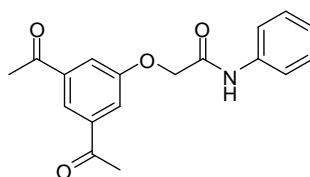
HPLC: 55,29 % B; MS ber.: 311,12, MS gef.: 312,15 (M+H)⁺.

6) *N*-(3,5-Diacetylphenyl)-2-(3,5-diacetylphenoxy)acetamid

71 mg (0,28 mmol) des Intermediats **2**, 50 mg (0,28 mmol) des Intermediats **4** und 91 mg (0,28 mmol) Cs_2CO_3 wurden in 5 mL ACN suspendiert und zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der verbleibende Feststoff in ges. NaHCO_3 -Lösung aufgenommen. Das Produkt wurde dreimal mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen dreimal mit 5 % KHSO_4 -Lösung und dreimal mit ges. NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 70 mg (63,6 % der Theorie), brauner Feststoff.

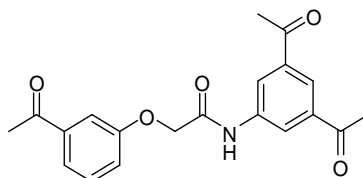
HPLC: 48,8 % B; MS ber.: 395,14, MS gef.: 396,2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

7) 2-(3,5-Diacetylphenoxy)-*N*-phenylacetamid

19 mg (0,11 mmol) des Intermediats **3**, 20 mg (0,11 mmol) des Intermediats **4** und 43 mg (0,13 mmol) Cs_2CO_3 wurden in 5 mL ACN suspendiert und vier Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der verbleibende Feststoff in ges. NaHCO_3 -Lösung aufgenommen. Das Produkt wurde dreimal mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen dreimal mit 5 % KHSO_4 -Lösung und zweimal mit ges. NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 26 mg (74,7 % der Theorie), gelber Feststoff.

HPLC: 49,1 % B; MS ber.: 311,12, MS gef.: 333,9 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺.

8) 2-(3-Acetylphenoxy)-*N*-(3,5-diacetylphenyl)acetamid

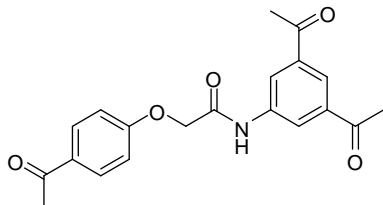
60 mg (0,23 mmol) des Intermediats **2**, 48 mg (0,35 mmol) 3-Hydroxyacetophenon und 116 mg (0,35 mmol) Cs_2CO_3 wurden in 5 mL ACN suspendiert und vier Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in ges. NaHCO_3 -Lösung aufgenommen. Das Produkt wurde dreimal mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen dreimal mit 5 % KHSO_4 -Lösung und zweimal mit

ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 79 mg (94,4 % der Theorie), bräunlicher Feststoff.

HPLC: 49,0 % B; MS ber.: 353,13, MS gef.: 354,20 (M+H)⁺.

9) 2-(4-Acetylphenoxy)-N-(3,5-diacetylphenyl)acetamid

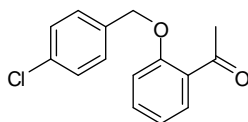


100 mg (0,39 mmol) des Intermediats **2**, 80 mg (0,59 mmol) 4-Hydroxyacetophenon und 193 mg (0,59 mmol) Cs₂CO₃ wurden in 5 mL ACN suspendiert und vier Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in ges. NaHCO₃-Lösung aufgenommen. Das Produkt wurde dreimal mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen dreimal mit 5 %-KHSO₄ Lösung, zweimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 122 mg (87,7 % der Theorie), gelber Feststoff.

HPLC: 47,3 % B; MS ber.: 353,13, MS gef.: 354,21 (M+H)⁺.

10) 1-(2-(4-Chlorbenzyloxy)phenyl)ethanon

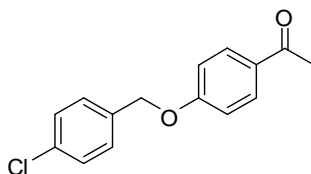


0,25 g (1,83 mmol) 2-Hydroxyacetophenon wurden mit *para*-Chlorbenzylbromid nach Vorschrift A umgesetzt.

Ausbeute: 1,0 g, gelbes Öl.

HPLC: 66,5 % B; MS ber.: 260,06, MS gef.: 261,06 (M+H)⁺.

11) 1-(4-(4-Chlorbenzyloxy)phenyl)ethanon

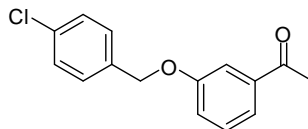


0,25 g (1,83 mmol) 4-Hydroxyacetophenon wurden mit *para*-Chlorbenzylbromid nach Vorschrift A umgesetzt.

Ausbeute: 0,54 g, gelber Feststoff.

HPLC: 65,9 % B; MS ber.: 260,06, MS gef.: 261,0 (M+H)⁺.

12) 1-(3-(4-Chlorbenzyloxy)phenyl)ethanon



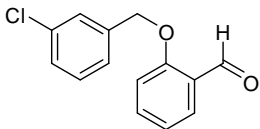
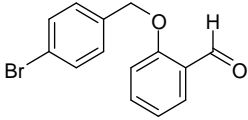
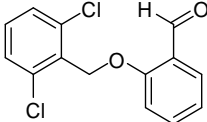
0,25 g (1,83 mmol) 3-Hydroxyacetophenon wurden mit *para*-Chlorbenzylbromid nach Vorschrift A umgesetzt.

Ausbeute: 0,61 g, gelber Feststoff.

HPLC: 66,0 % B; MS ber.: 260,06, MS gef.: 261,0 (M+H)⁺.

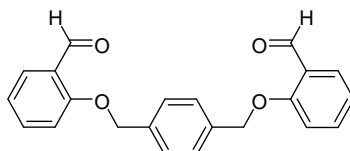
Die Verbindungen in der folgenden Tabelle wurden nach der allgemeinen Vorschrift A aus Salicylaldehyd und den entsprechenden Benzylbromiden dargestellt:

Nr.	Formel des Produkts	Menge Salicylaldehyd	Ausbeute	HPLC (% B)	MS ber. / gef.
13		0,25 g	0,57 g, gelbes Öl	68,6	246,04 / 247,15 (M+H) ⁺
14		1,04 g	1,21 g, brauner Feststoff	57,3	237,08 / 238,18 (M+H) ⁺
15		0,5 g	0,89 g, orangener Feststoff	61,7	212,08 / 213,15 (M+H) ⁺
16 ^a		0,5 g	0,43 g, grauer Feststoff	49,8	270,09 / 288,15 (M+NH ₄) ⁺
17		0,5 g	1,05 g, gelber Feststoff	60,4	257,07 / 258,16 (M+H) ⁺
18		0,5 g	1,07 g, brauner Feststoff	70,3	262,10 / 263,17 (M+H) ⁺
19		0,5 g	0,97 g, gelber Feststoff	62,0	230,07 / 231,17 (M+H) ⁺
20		0,5 g	0,88 g, gelber Feststoff	68,0	280,07 / 281,10 (M+H) ⁺

21		0,5 g	0,87 g, orangener Feststoff	66,4	247,04 / 247,11 (M+H) ⁺
22		0,5 g	1,49 g, brauner Feststoff	68,1	289,99 / 291,01 (M+H) ⁺
23		0,5 g	1,46 g, brauner Feststoff	69,6	280,01 / 281,05 (M+H) ⁺

^a Diese Verbindung wurde, abweichend von der allgemeinen Vorschrift, nicht gewaschen, sondern nach Entfernung des Lösungsmittels direkt weiter umgesetzt.

24) 2,2'-(1,4-Phenyl-bis(methyl))-bis(oxy)dibenzaldehyd

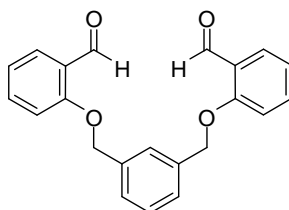


0,5 g (4,1 mmol) 2-Hydroxybenzaldehyd wurden nach Vorschrift A, jedoch nur mit 0,6 Äquivalenten 1,4-Bis(Brommethyl)benzol umgesetzt.

Ausbeute: 0,75 g (90,0 % der Theorie), grauer Feststoff.

HPLC: 68,5 % B; MS ber.: 346,12, MS gef.: 347,19 (M+H)⁺.

25) 2,2'-(1,3-Phenyl-bis(methyl))-bis(oxy)dibenzaldehyd

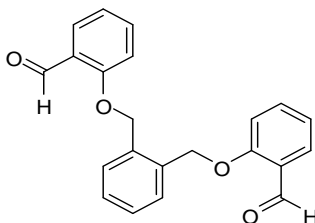


0,5 g (4,1 mmol) 2-Hydroxybenzaldehyd wurden nach Vorschrift A, jedoch nur mit 0,6 Äquivalenten 1,3-Bis(Brommethyl)benzol umgesetzt.

Ausbeute: 0,67 g (79,5 % der Theorie), gelber Feststoff.

HPLC: 68,1 % B.

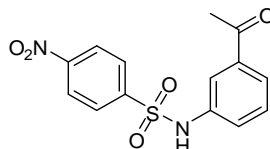
26) 2,2'-(1,2-Phenyl-bis(methyl))-bis(oxy)dibenzaldehyd



0,5 g (4,1 mmol) 2-Hydroxybenzaldehyd wurden nach Vorschrift A, jedoch nur mit 0,6 Äquivalenten 1,2-Bis(brommethyl)benzol umgesetzt.

Ausbeute: 0,44 g (52,3 % der Theorie), grauer Feststoff.
HPLC: 66,7 % B; MS ber.: 346,12, MS gef.: 347,19 (M+H)⁺.

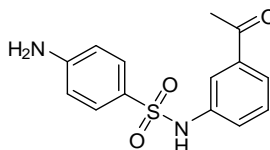
27) N-(3-Acetylphenyl)-4-nitrophenylsulfonamid



0,5 g (3,7 mmol) 3-Aminoacetophenon und 1,06 g (4,8 mmol) *para*-Nitrobenzolsulfonsäurechlorid wurden in 10 mL trockenem DCM gelöst. Zu der Lösung wurden 820 µL DIPEA (4,81 mmol) gegeben und der Ansatz eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in EtOAc suspendiert. Nach Absaugen verblieb ein weißer Feststoff, der im Feinvakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: 0,95 g (80,5 % der Theorie), weißer Feststoff.
HPLC: 66,4 % B; MS ber.: 320,05, MS gef.: 321,0 (M+H)⁺.

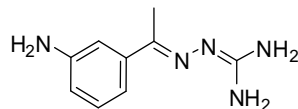
28) N-(3-Acetylphenyl)-4-aminophenylsulfonamid



0,4 g (1,25 mmol) des Intermediats **27** wurden in 100 mL EtOAc gelöst und mit 1,8 g (6,25 mmol) Zinn(II)chlorid × H₂O versetzt. Der Ansatz wurde für vier Stunden bei 80 °C, dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Mutterlauge wurde zweimal mit Wasser, dreimal mit ges. NaHCO₃-Lösung und zweimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 0,25 g (70,3 % der Theorie), brauner Feststoff.
HPLC: 48,0 % B; MS ber.: 290,07, MS gef.: 312,9 (M+Na)⁺.

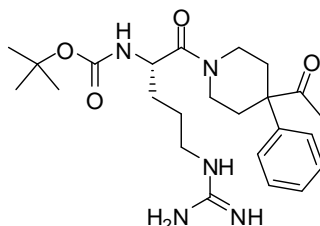
29) (E)-2-(1-(3-Aminophenyl)ethyliden)diaminomethylenhydrazon × 2 TFA



0,15 g (1,09 mmol) 3-Aminoacetophenon wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,39 g (84,9 % der Theorie), weißer Feststoff.
HPLC: 14,1 % B; MS ber.: 191,12, MS gef.: 192,0 (M+H)⁺.

30) Boc-Arg-(4-Acetyl-4-phenyl)piperidin × TFA

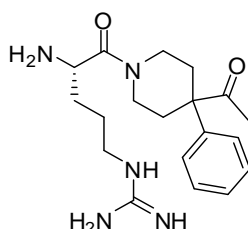


0,15 g (0,627 mmol) 4-Acetyl-4-phenylpiperidin × HCl wurden mit Boc-Arginin × HCl nach Vorschrift C gekoppelt und mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0,28 g (76,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 42,8 % B; MS ber.: 459,28, MS gef.: 460,2 (M+H)⁺.

31) H-Arg-(4-Acetyl-4-phenyl)piperidin × 2 TFA

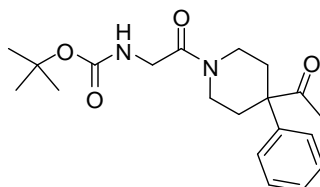


Von 0,15 g (0,26 mmol) des Intermediats **30** wurde die Boc-Schutzgruppe nach Vorschrift H abgespalten, das Produkt gefällt und lyophilisiert.

Ausbeute: 0,15 g (98,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 26,3 % B; MS ber.: 359,23, MS gef.: 360,26 (M+H)⁺.

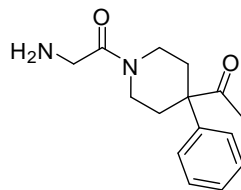
32) Boc-Gly-(4-Acetyl-4-phenyl)piperidin



0,15 g (0,627 mmol) 4-Acetyl-4-phenylpiperidin × HCl wurden mit Boc-Glycin nach Vorschrift C gekoppelt und anschließend gewaschen.

Ausbeute: 0,22 g (97,3 % der Theorie), weißer Feststoff.

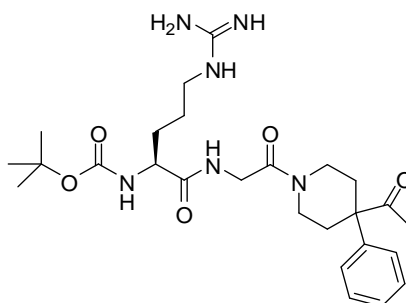
HPLC: 53,3 % B; MS ber.: 360,20, MS gef.: 361,23 (M+H)⁺.

33) H-Gly-(4-Acetyl-4-phenyl)piperidin × TFA

Von 0,15 g (0,41 mmol) des Intermediats **32** wurde die Boc-Schutzgruppe nach Vorschrift H abgespalten, das Produkt gefällt und lyophilisiert.

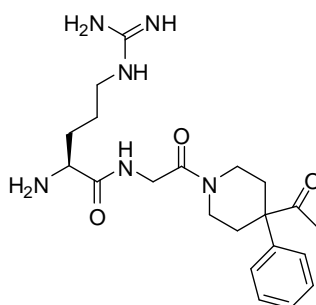
Ausbeute: 0,16 g, rötlicher Feststoff.

HPLC: 31,4 % B; MS ber.: 260,15, MS gef.: 261,18 (M+H)⁺.

34) Boc-Arg-Gly-(4-Acetyl-4-phenyl)piperidin

0,1 g (0,26 mmol) des Intermediats **33** wurden an Boc-Arginin × HCl nach Vorschrift C gekoppelt. Abweichend von Vorschrift C wurde nach zwei Stunden das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das resultierende Öl direkt ohne weitere Charakterisierung zu Derivat **35** umgesetzt.

HPLC: 42,6 % B HPLC 2.

35) H-Arg-Gly-(4-Acetyl-4-phenyl)piperidin × 2 TFA

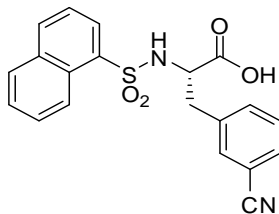
Das resultierende Öl aus **34** wurde nach Vorschrift H behandelt, gefällt und lyophilisiert.

Ausbeute: 0,17 g (99,4 % der Theorie), rötlicher Feststoff.

HPLC: 27,3 % B; MS ber.: 416,25, MS gef.: 417,25 (M+H)⁺.

7.5.2 Synthese von Vorstufen für Inhibitoren des TAPAP-Typs

36) α -Nas-Phe(3-CN)-OH (Stürzebecher et al., 2004)

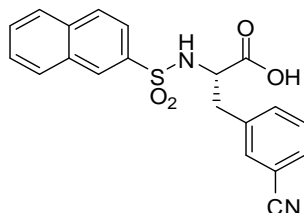


1,0 g (5,67 mmol) 3-Cyanophenylalanin und 2,40 mL (14,16 mmol) DIPEA wurden in 26 mL eines Gemischs aus DMF und Wasser (2:1) gelöst. Unter Eiskühlung wurde portionsweise 1,5 g (6,61 mmol) α -Naphthylsulfonylchlorid zugegeben und der Ansatz vier Stunden bei 0 °C gerührt. Der Ansatz wurde auf Eis gegossen und dreimal mit MTBE gewaschen. Die verbliebene wässrige Phase wurde mit HCl angesäuert und das Produkt dreimal mit MTBE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 1,19 g (55,3 % der Theorie), gelber Feststoff.

HPLC: 49,8 % B; MS ber.: 380,08, MS gef.: 398,05 (M+NH₄)⁺.

37) β -Nas-Phe(3-CN)-OH

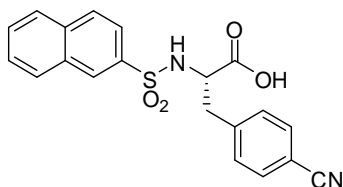


1,0 g (5,67 mmol) 3-Cyanophenylalanin wurden mit 1,5 g (6,61 mmol) β -Naphthylsulfonylchlorid umgesetzt, wie zuvor für Intermediat **36** beschrieben.

Ausbeute: 1,47 g (70,8 % der Theorie), gelber Feststoff.

HPLC: 51,2 % B; MS ber.: 380,08, MS gef.: 398,07 (M+NH₄)⁺.

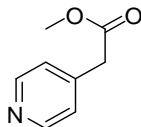
38) β -Nas-Phe(4-CN)-OH



1,0 g (4,40 mmol) 4-Cyanophenylalanin \times HCl wurden mit 1,5 g (6,61 mmol) β -Naphthylsulfonylchlorid umgesetzt, wie zuvor für Intermediat **36** beschrieben.

Ausbeute: 0,25 g (14,8 % der Theorie), gelber Feststoff.

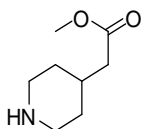
HPLC: 51,3 % B; MS ber.: 380,08, MS gef.: 398,31 (M+NH₄)⁺.

39) 2-(Pyridin-4-yl)essigsäuremethylester

1,88 g (13,75 mmol) 2-(Pyridin-4-yl)essigsäure wurden in 12,5 mL Methanol suspendiert und auf -10 °C gekühlt. Portionsweise wurden 3,25 mL (16,6 mmol) Thionylchlorid hinzugegeben und 30 Minuten bei -10 °C, dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand im Exsiccator getrocknet.

Ausbeute: 2,03 g (98 % der Theorie), weißer Feststoff.

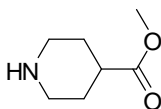
HPLC: 10,6 % B; DC: R_f 0,65; MS ber.: 151,06, MS gef.: 152,06 (M+H)⁺.

40) 2-(Piperidin-4-yl)essigsäuremethylester × HAc (Egbertson et al., 1994)

1,5 g (9,92 mmol) des Intermediats **39** wurden in 150 mL 90 % HAc gelöst und mit 35 mg PtO₂ versetzt. Der Ansatz wurde unter H₂-Atmosphäre für zwei Tage bei 50 °C und für weitere zwei Tage bei Raumtemperatur hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das verbleibende, farblose Öl wurde mit n-Hexan versetzt und das Lösungsmittel entfernt. Dieser Vorgang wurde sechsmal wiederholt.

Ausbeute: 1,17 g (75,4 % der Theorie), weißer Feststoff.

DC: R_f 0,51; MS ber.: 157,11, MS gef.: 158,13 (M+H)⁺.

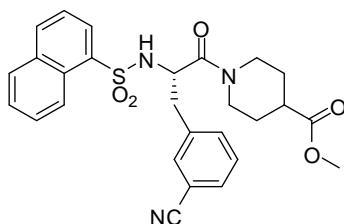
41) Isonipecotinsäuremethylester × HCl

7,09 g (55 mmol) Isonipecotinsäure wurden in 50 mL Methanol suspendiert und auf -10 °C gekühlt. Portionsweise wurden 13 mL (66,56 mmol) Thionylchlorid hinzugegeben und bei -10 °C für 30 Minuten, dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand im Exsiccator getrocknet.

Ausbeute: 9,6 g (96,9 % der Theorie), weißer Feststoff.

DC: R_f 0,46; MS ber.: 143,09, MS gef.: 144,06 (M+H)⁺.

42) α -Nas-Phe(3-CN)-iNip-OMe

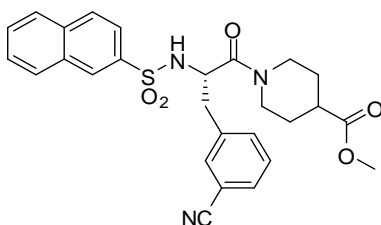


0,12 g (0,83 mmol) des Intermediats **41** wurden nach Vorschrift C an Intermediat **36** gekoppelt. Der Rückstand wurde mit EtOAc aufgenommen und das Produkt entsprechend der allgemeinen Vorschrift gewaschen.

Ausbeute: 0,56 g, gelbes Öl.

HPLC: 56,9 % B; MS ber.: 505,17, MS gef.: 523,18 ($M+NH_4$)⁺.

43) β -Nas-Phe(3-CN)-iNip-OMe

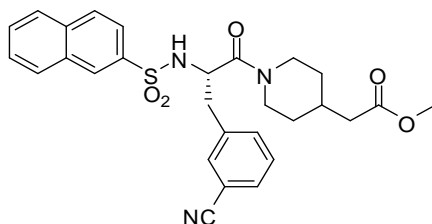


0,24 g (1,65 mmol) des Intermediats **41** wurden nach Vorschrift C an Intermediat **37** gekoppelt. Der Rückstand wurde mit EtOAc aufgenommen und das Produkt entsprechend der allgemeinen Vorschrift gewaschen.

Ausbeute: 1,18 g, gelber Feststoff.

HPLC: 57,4 % B; MS ber.: 505,17, MS gef.: 506,21 ($M+H$)⁺.

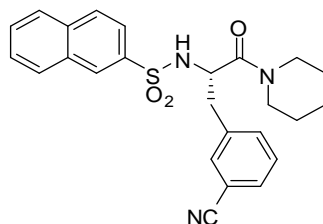
44) β -Nas-Phe(3-CN)-Pip(4-Essigsäuremethylester)



0,17 g (1,09 mmol) des Intermediats **40** wurden nach Vorschrift C an Intermediat **37** gekoppelt. Der Rückstand wurde mit EtOAc aufgenommen und das Produkt entsprechend der allgemeinen Vorschrift gewaschen.

Ausbeute: 0,63 g, gelbes Öl.

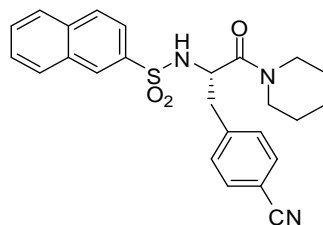
HPLC: 59,1 % B MS ber.: 519,18, MS gef.: 537,41 ($M+NH_4$)⁺.

45) β -Nas-Phe(3-CN)-Pip

0,18 g (2,16 mmol) Piperidin wurden nach Vorschrift C an Intermediat **37** gekoppelt. Der Rückstand wurde mit EtOAc aufgenommen und das Produkt entsprechend der allgemeinen Vorschrift gewaschen.

Ausbeute: 0,89 g, gelber Feststoff.

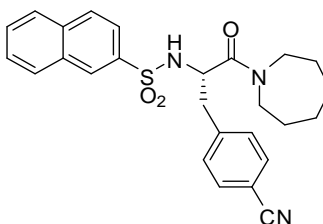
HPLC: 61,5 % B; MS ber.: 447,16, MS gef.: 448,09 (M+H)⁺.

46) β -Nas-Phe(4-CN)-Pip

56 mg (0,65 mmol) Piperidin wurden nach Vorschrift C an Intermediat **38** gekoppelt. Der Rückstand wurde mit EtOAc aufgenommen und das Produkt entsprechend der allgemeinen Vorschrift gewaschen.

Ausbeute: 0,15 g, gelbes Öl.

HPLC: 61,0 % B; MS ber.: 447,16, MS gef.: 465,33 (M+NH₄)⁺.

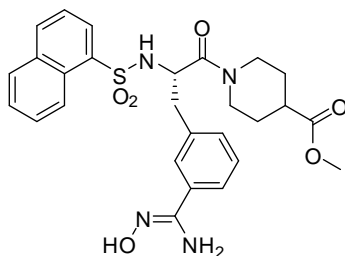
47) β -Nas-Phe(4-CN)-homoPip

60 mg (0,65 mmol) Homopiperidin wurden nach Vorschrift C an Intermediat **38** gekoppelt. Der Rückstand wurde mit EtOAc aufgenommen und das Produkt entsprechend der allgemeinen Vorschrift gewaschen.

Ausbeute: 0,15 g, gelbes Öl.

HPLC: 63,2 % B; MS ber.: 461,18, MS gef.: 479,14 (M+NH₄)⁺.

48) α -Nas-Phe(3-Hydroxyamidino)-iNip-OMe

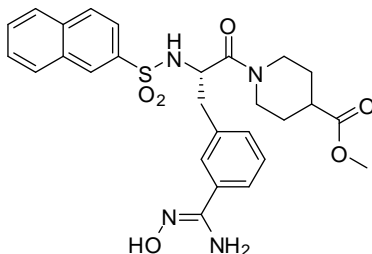


0,3 g (0,59 mmol) des Intermediats **42** wurden nach Vorschrift J umgesetzt.

Ausbeute: 0,32 g, weißer Feststoff.

HPLC: 40,9 % B.

49) β -Nas-Phe(3-Hydroxyamidino)-iNip-OMe

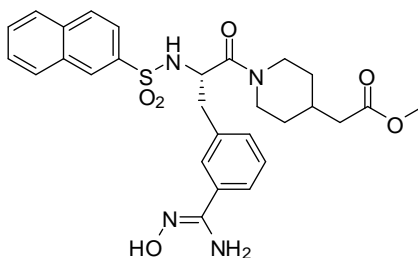


0,6 g (1,18 mmol) des Intermediats **43** wurden nach Vorschrift J umgesetzt.

Ausbeute: 0,2 g (31,0 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 42,5 % B; MS ber.: 538,19, MS gef.: 539,16 (M+H)⁺.

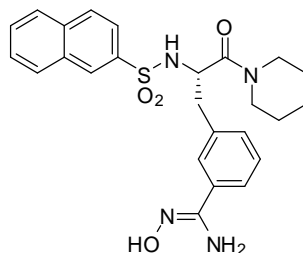
50) β -Nas-Phe(3-Hydroxyamidino)-Pip(4-Essigsäuremethylester)



0,27 g (0,52 mmol) des Intermediats **44** wurden nach Vorschrift J umgesetzt.

Ausbeute: 0,22 g (77,8 % der Theorie), gelber Feststoff.

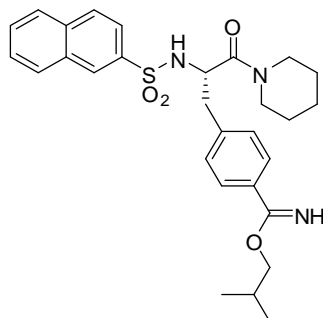
HPLC: 43,4 % B; MS ber.: 552,20, MS gef.: 553,25 (M+H)⁺.

51) β -Nas-Phe(3-Hydroxyamidino)-Pip

0,30 g (0,67 mmol) des Intermediats **45** wurden nach Vorschrift J umgesetzt, abweichend von der allgemeinen Vorschrift jedoch nicht gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde das Produkt direkt weiter zu **MI-0369** umgesetzt.

Ausbeute: Es wurde keine Ausbeute bestimmt, farbloses Öl.

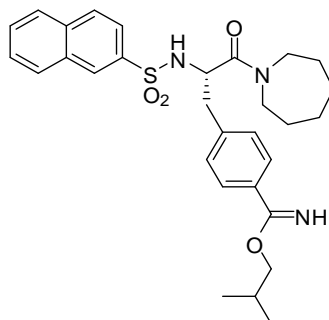
HPLC: 42,5 % B.

52) β -Nas-Phe(4-Isobutylbenzimidat)-Pip \times HCl

37,5 mg (0,084 mmol) des Intermediats **46** wurden in 0,5 mL 1,4-Dioxan und 20 mL Isobutanol gelöst und mit 1 mL HCl in Dioxan (4 M) versetzt. Der Ansatz wurde bei 4 °C im Kühlschrank für insgesamt acht Tage gelagert. Jeden zweiten Tag wurden 0,2 mL HCl in Dioxan (4 M) nachdosiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: Es wurde keine Ausbeute bestimmt, weißer Feststoff.

HPLC: 50,7 % B.

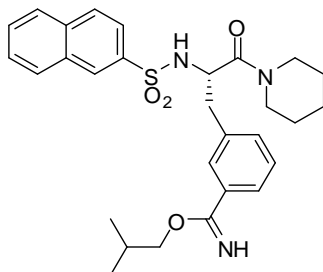
53) β -Nas-Phe(4-Isobutylbenzimidat)-homoPip \times HCl

0,14 g (0,3 mmol) des Intermediats **47** wurden in 0,5 mL Isobutanol gelöst und mit 1,5 mL HCl in Dioxan (4 M) versetzt. Der Ansatz wurde bei 4 °C im Kühlschrank für vier Tage gelagert. Nach zwei Tagen wurden 0,2 mL HCl in Dioxan (4 M) nachdosiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: Es wurde keine Ausbeute bestimmt, weißer Feststoff.

HPLC: 52,3 % B.

54) β -Nas-Phe(3-Isobutylbenzimidat)-Pip \times HCl



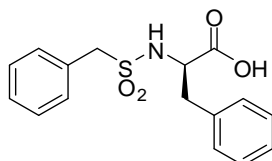
0,24 g (0,54 mmol) des Intermediats **45** wurden in 0,5 mL Isobutanol gelöst und mit 1,5 mL HCl in Dioxan (4 M) versetzt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für sieben Tage gelagert. Bei einer Umsatzrate von 69 % (HPLC) wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: Es wurde keine Ausbeute bestimmt, gelbes Öl.

HPLC: 50,3 % B.

7.5.3 Synthese von Vorstufen substratanaloger Inhibitoren

55) Bzls-D-Phe-OH

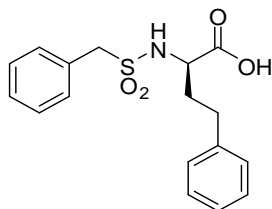


0,5 g (3,02 mmol) H-D-Phe-OH wurden nach Vorschrift G umgesetzt.

Ausbeute: 1,04 g, brauner Feststoff.

HPLC: 48,8 % B; MS ber.: 319,09, MS gef.: 320,08 (M+H)⁺.

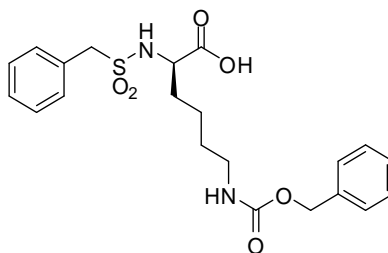
56) Bzls-D-hPhe-OH (Stürzebecher, 2005)



0,3 g (1,67 mmol) H-D-hPhe-OH wurden nach Vorschrift G umgesetzt.

Ausbeute: 0,41 g (74,0 % der Theorie), brauner Feststoff.

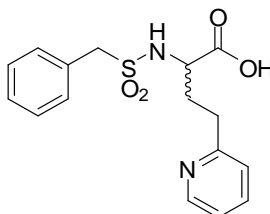
HPLC: 44,9 % B HPLC 2; MS ber.: 333,10, MS gef.: 332,15 (M-H)⁻.

57) Bzls-D-Lys(Cbz)-OH

0,5 g (1,78 mmol) H-D-Lys(Cbz)-OH wurden nach Vorschrift G umgesetzt.

Ausbeute: 0,37 g (84,3 % der Theorie), brauner Feststoff.

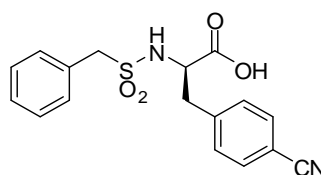
HPLC: 52,3 % B; MS ber.: 434,15, MS gef.: 433,23 (M-H)⁻.

58) Bzls-D,L-hAla(2-Pyr)-OH (Stürzebecher, 2005)

0,5 g (3,01 mmol) H-D,L-hAla(2-Pyr)-OH wurden in 10 mL 1 M K₂CO₃-Lösung suspendiert und auf 80 °C erhitzt. Portionsweise wurden 0,57 g (3,01 mmol) Benzylsulfonylchlorid zugegeben und für weitere 30 Minuten auf 80 °C erhitzt. Der Ansatz wurde mit HCl angesäuert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde präparativ mittels HPLC isoliert und aus 80 % *tert.*-BuOH lyophilisiert.

Ausbeute: 0,11 g (9,3 % der Theorie), brauner Feststoff.

HPLC: 25,8 % B; MS ber.: 334,10, MS gef.: 335,05 (M+H)⁺.

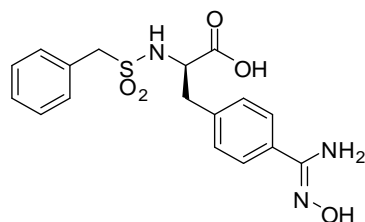
59) Bzls-D-Phe(4-CN)-OH

0,6 g (2,65 mmol) H-D-Phe(4-CN)-OH wurden nach Vorschrift G umgesetzt.

Ausbeute: 0,64 g (70,1 % der Theorie), gelber Feststoff.

HPLC: 48,1 % B; MS ber.: 344,08, MS gef.: 362,0 (M+NH₄)⁺.

60) Bzls-D-Phe(4-Hydroxyamidino)-OH

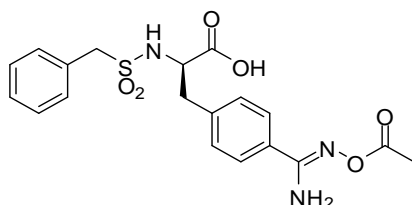


0,3 g (0,87 mmol) des Intermediats **59** wurden nach Vorschrift J umgesetzt. Abweichend von der allgemeinen Vorschrift wurde der gelbe Rückstand nach Entfernung des Lösungsmittels nicht gewaschen sondern direkt weiter zu Verbindung **61** umgesetzt.

Ausbeute: wurde nicht bestimmt, gelbes Öl.

HPLC: 31,0 % B; MS ber.: 377,10, MS gef.: 378,06 (M+H)⁺.

61) Bzls-D-Phe(4-Acetylhydroxyamidino)-OH

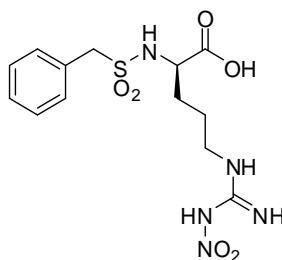


Das gesamte Rohprodukt von **60** wurde in 10 mL Eisessig gelöst und mit 300 µL (3,15 mmol) Acetanhydrid versetzt. Nach zehn Minuten wurde der Ansatz mit Wasser verdünnt und das Produkt zweimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 0,40 g, gelbes Öl.

HPLC: 40,4 % B; MS ber.: 419,12, MS gef.: 418,26 (M-H)⁻.

62) Bzls-D-Arg(NO₂)-OH (Sisay et al., 2010)



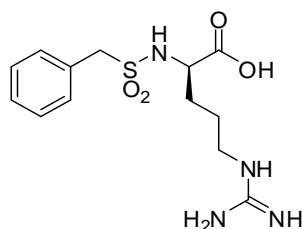
3,0 g (13,7 mmol) H-D-Arg(NO₂)-OH und 10,4 g (54,7 mmol) Benzylsulfonylchlorid wurden in 150 mL eines Gemischs aus Wasser und ACN (4:1) suspendiert. Unter Eiskühlung wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 8 eingestellt und über Nacht gerührt. Es wurde wiederholt 1 M NaOH zugegeben, um den pH-Wert bei 8 zu halten. Der Ansatz wurde zweimal mit EtOAc gewaschen, dann die Wasserphase mit HCl angesäuert und

das Produkt zweimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 0,82 g (15,9 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 30,5 % B; MS ber.: 373,11, MS gef.: 374,44 (M+H)⁺.

63) Bzls-D-Arg-OH × HCl

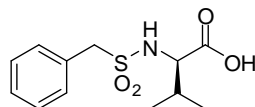


1,2 g (3,2 mmol) des Intermediats **62** wurden in 150 mL MeOH gelöst. Nach Zugabe von 10 mol% Pd/C und 1 mL HAc wurde der Ansatz für fünf Tage bei Raumtemperatur unter H₂-Atmosphäre hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit HCl aufgenommen und im Vakuum wieder eingengt, anschließend noch dreimal mit Wasser aufgenommen und jeweils eingengt. Der Rückstand wurde aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 0,87 g (76,2 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 25,1 % B.

64) Bzls-D-Val-OH

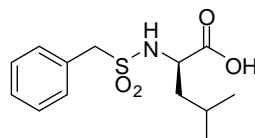


1,0 g (8,54 mmol) H-D-Val-OH wurde nach Vorschrift G umgesetzt.

Ausbeute: 2,07 g (89,6 % der Theorie), brauner Feststoff.

HPLC: 40,0 % B; MS ber.: 271,09, MS gef.: 289,11 (M+NH₄)⁺.

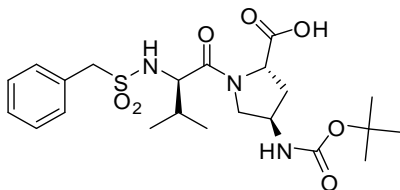
65) Bzls-D-Leu-OH



1,0 g (7,62 mmol) H-D-Leu-OH wurde nach Vorschrift G umgesetzt.

Ausbeute: 2,09 g (96,3 % der Theorie), brauner Feststoff.

HPLC: 46,0 % B; MS ber.: 285,10, MS gef.: 308,1 (M+Na)⁺.

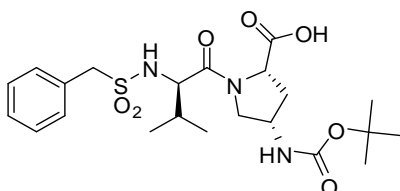
66) Bzls-D-Val-Pro(4R-Boc-Amino)-OH

103 mg (0,236 mmol) Fmoc-Pro(4R-Boc-Amino)-OH wurden in 2 mL trockenem DCM suspendiert und mit 0,16 mL (0,92 mmol) DIPEA versetzt. Diese Lösung wurde auf 0,15 g (entsprechend 0,225 mmol) Tritylchlorid-Harz gegeben und die Suspension für zwei Stunden in 5 ml Spritzen mit Teflonfritten (Intavis, Köln) geschüttelt. Nach Entfernen der Reaktionslösung wurde das Harz dreimal mit einer Lösung von DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) behandelt. Es folgte mehrmaliges Waschen mit DCM, DMF und wieder DCM.

Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz zweimal mit einer Lösung von 20 % Piperidin in DMF behandelt (5 und 15 Minuten) und danach mehrfach mit DMF gewaschen. Auf das gewaschene Harz wurde eine Lösung von 0,24 g (0,9 mmol) des Intermediats **64**, 0,34 g (0,9 mmol) HBTU, 0,12 g (0,9 mmol) HOBt und 0,23 mL (1,8 mmol) DIPEA gegeben. Der Ansatz wurde zweieinhalb Stunden geschüttelt, anschließend die Reaktionslösung entfernt und das Harz mehrfach mit DMF und DCM gewaschen. Das Produkt wurde mit 1 % TFA in DCM unter Zusatz von 5 % TIS vom Harz abgespalten und nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 0,9 g (78,0 % der Theorie), weißer Feststoff.

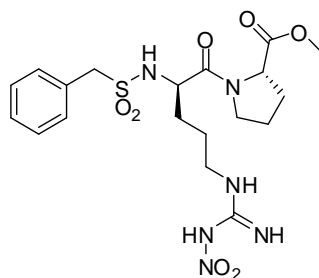
HPLC: 48,8 % B; MS ber.: 483,20, MS gef.: 501,21 ($M+NH_4$)⁺.

67) Bzls-D-Val-Pro(2S-Boc-Amino)-OH

Die Synthese erfolgte analog der Reaktion zur Herstellung des Intermediats **66**, mit dem Unterschied, dass zur initialen Beladung des Harzes 103 mg (0,236 mmol) Fmoc-Pro(4S-Boc-Amino)-OH verwendet wurden.

Ausbeute: 0,85 g (73,9 % der Theorie), weißer Feststoff.

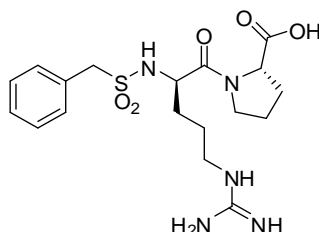
HPLC: 49,7 % B; MS ber.: 483,20, MS gef.: 501,25 ($M+NH_4$)⁺.

68) Bzls-D-Arg(NO₂)-Pro-OMe (Sisay et al., 2010)

0,65 g (1,75 mmol) des Intermediats **62** wurden nach Vorschrift C an 0,33 g (2,0 mmol) H-Pro-OMe \times HCl gekoppelt. Das Produkt wurde in EtOAc aufgenommen und gewaschen. Das verbleibende braune Öl wurde direkt zu Verbindung **69** umgesetzt.

Ausbeute: wurde nicht bestimmt, braunes Öl.

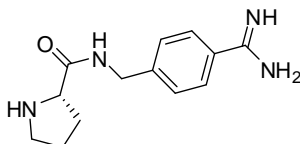
HPLC: 37,5 % B; MS ber.: 484,17, MS gef.: 523,1 (M+K)⁺.

69) Bzls-D-Arg-Pro-OH \times HCl (Sisay et al., 2010)

Das gesamte braune Öl von **68** wurde in 30 mL 50 % 1,4-Dioxan in Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 12 eingestellt und der Ansatz bei Raumtemperatur für sechs Stunden gerührt. Der Ansatz wurde mit TFA angesäuert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 90 % HAc aufgenommen und nach Zugabe von 10 mol% Pd/C für drei Tage unter H₂-Atmosphäre bei Raumtemperatur hydriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, das resultierende Öl in verdünnter HCl aufgenommen und wieder eingengt, um das Hydrochlorid zu erhalten. Das resultierende Öl wurde aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 1,1 g, weißer Feststoff.

HPLC: 28,4 % B; MS ber.: 425,17, MS gef.: 426,17 (M+H)⁺.

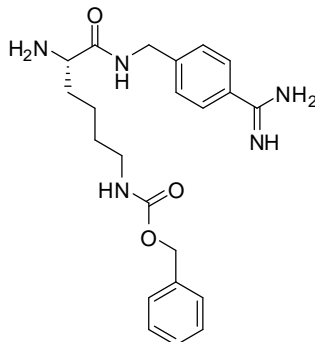
70) H-Pro-4-Amidinobenzylamid \times 2 HCl (Steinmetzer and Nowak, 2002)

2,0 g (4,56 mmol) Cbz-Pro-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid wurden in 200 mL 90 % Essigsäure mit 50 mg Pd/C unter H₂-Atmosphäre für vier Tage bei Raumtemperatur hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit HCl aufgenommen und die Lösung im Vakuum eingengt. Das Hydrochlorid wurde insgesamt viermal in Wasser gelöst und wieder eingengt und anschließend aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 1,42 g (97,6 % der Theorie), brauner Feststoff.

DC: R_f 0,10; MS ber.: 246,15, MS gef.: 247,14 ($M+H$)⁺.

71) H-Lys(Cbz)-4-Amidinobenzylamid \times 2 TFA

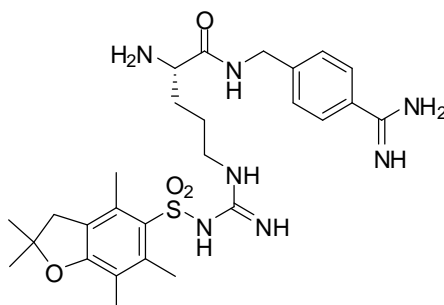


1,0 g (2,63 mmol) Boc-Lys(Cbz)-OH und 0,6 g (2,63 mmol) 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl (Becker et al., 2010) wurden nach Vorschrift D gekoppelt. Abweichend von der allgemeinen Vorschrift wurde nach Entfernen des Lösungsmittels der Rückstand mit 5 mL 90 % TFA versetzt und eine Stunde stehen gelassen. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde das Produkt mittels HPLC aufgereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 0,78 g (58,0 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 31,3 % B; MS ber.: 411,23, MS gef.: 412,24 ($M+H$)⁺.

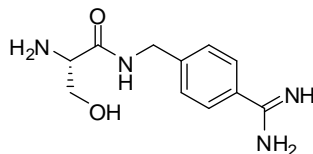
72) H-Arg(Pbf)-4-Amidinobenzylamid \times 2 TFA



0,375 g (1,7 mmol) 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl wurden nach Vorschrift C an 1,0 g (1,54 mmol) Fmoc-Arg(Pbf)-OH gekoppelt. Abweichend von der allgemeinen Vorschrift, wurde nach zwölf Stunden das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit einer Lösung von 10 % Diethylamin in DMF versetzt und der Ansatz für eineinhalb Stunden gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 0,48 g (46,8 % der Theorie), weißer Feststoff.

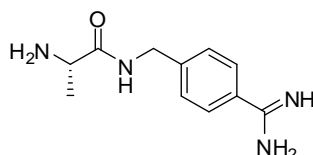
HPLC: 36,9 % B; MS ber.: 557,0, MS gef.: 558,01 ($M+H$)⁺.

73) H-Ser-4-Amidinobenzylamid \times 2 TFA

0,59 g (2,68 mmol) 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl wurden nach Vorschrift C an 0,5 g (2,43 mmol) Boc-Ser-OH gekoppelt. Abweichend von der allgemeinen Vorschrift wurde nach zwölf Stunden das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 90 % TFA versetzt und der Ansatz für eineinhalb Stunden gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in wenig MeOH gelöst und das Produkt in kaltem Diethylether gefällt. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt und aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 0,39 g (34,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

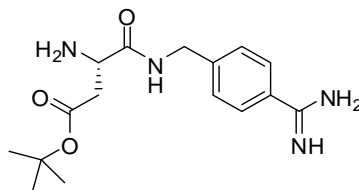
HPLC: 23,2 % B (mit Boc-Schutzgruppe); MS ber.: 236,13, MS gef.: 236,9 (M+H)⁺.

74) H-Ala-4-Amidinobenzylamid

0,5 g (1,6 mmol) Fmoc-Ala-OH wurden nach Vorschrift E an 0,35 g (1,6 mmol) 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl gekoppelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit einer Lösung von 50 % Dicyclohexylamin in DMF versetzt und für eine Stunde gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig Methanol angelöst und das Produkt in Diethylether gefällt.

Ausbeute: 0,18 g (51,9 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 43,5 % B (mit Fmoc-Schutzgruppe); MS ber.: 220,13, MS gef.: 221,2 (M+H)⁺.

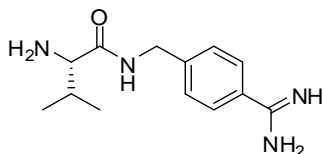
75) H-Asp(OtBu)-4-Amidinobenzylamid

0,5 g (1,2 mmol) Fmoc-Asp(OtBu)-OH wurden nach Vorschrift E an 0,27 g (1,2 mmol) 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl gekoppelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit einer Lösung von 50 % Dicyclohexylamin in DMF versetzt und für eine Stunde gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig Methanol angelöst und das Produkt in Diethylether gefällt.

Ausbeute: 0,22 g (46,8 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 19,8 % B; MS ber.: 320,18, MS gef.: 321,2 (M+H)⁺.

76) H-Val-4-Amidinobenzylamid \times 2 TFA

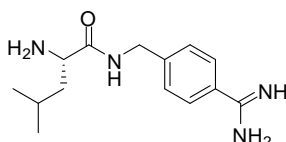


0,25 g (1,15 mmol) Boc-Val-OH wurden nach Vorschrift E an 0,25 g (1,15 mmol) 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl gekoppelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand nach Vorschrift H behandelt und das Produkt in Diethylether gefällt.

Ausbeute: 0,42 g (76,2 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 32,0 % B (mit Boc-Schutzgruppe); MS ber.: 248,16, MS gef.: 249,21 (M+H)⁺.

77) H-Leu-4-Amidinobenzylamid \times 2 TFA

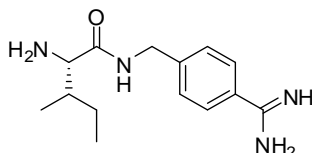


0,25 g (1,0 mmol) Boc-Leu-OH \times H₂O wurden nach Vorschrift E an 0,22 g (1,0 mmol) 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl gekoppelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand nach Vorschrift H behandelt und das Produkt in Diethylether gefällt.

Ausbeute: 0,41 g (83,5 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 36,8 % B (mit Boc-Schutzgruppe); MS ber.: 262,18, MS gef.: 263,20 (M+H)⁺.

78) H-Ile-4-Amidinobenzylamid \times 2 TFA

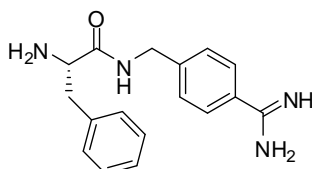


0,25 g (1,0 mmol) Boc-Ile-OH wurden nach Vorschrift E an 0,22 g (1,0 mmol) 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl gekoppelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand nach Vorschrift H behandelt und das Produkt in Diethylether gefällt.

Ausbeute: 0,35 g (66,9 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 35,9 % B (mit Boc-Schutzgruppe); MS ber.: 262,18, MS gef.: 263,23 (M+H)⁺.

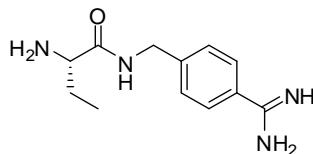
79) H-Phe-4-Amidinobenzylamid \times 2 TFA



0,25 g (0,94 mmol) Boc-Phe-OH wurden nach Vorschrift E an 0,20 g (0,94 mmol) 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl gekoppelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand nach Vorschrift H behandelt und das Produkt in Diethylether gefällt.

Ausbeute: 0,53 g, bräunlicher Feststoff.

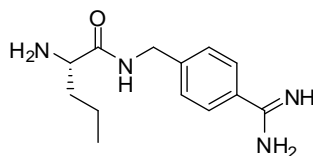
HPLC: 18,0 % B; MS ber.: 296,16, MS gef.: 297,10 (M+H)⁺.

80) H-Abu-4-Amidinobenzylamid \times 2 TFA

0,25 g (1,23 mmol) Boc-Abu-OH wurden nach Vorschrift E an 0,27 g (1,23 mmol) 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl gekoppelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand nach Vorschrift H behandelt und das Produkt in Diethylether gefällt.

Ausbeute: 1,02 g, bräunlicher Feststoff.

HPLC: 28,5 % B (mit Boc-Schutzgruppe); MS ber.: 234,15, MS gef.: 235,1 (M+H)⁺.

81) H-Nva-4-Amidinobenzylamid \times 2 TFA

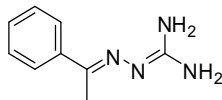
0,25 g (0,92 mmol) Boc-Nva-OH wurden nach Vorschrift E an 0,23 g (0,92 mmol) 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl gekoppelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand nach Vorschrift H behandelt und das Produkt in Diethylether gefällt.

Ausbeute: 0,94 g, bräunlicher Feststoff.

HPLC: 32,8 % B (mit Boc-Schutzgruppe); MS ber.: 248,16, MS gef.: 249,1 (M+H)⁺.

7.6 Synthese der Inhibitoren

MI-0300 (E)-2-(1-Phenylethyliden)diaminomethylenhydrazon \times HCl



1,0 g (8,32 mmol) Acetophenon wurde nach Vorschrift B umgesetzt und abweichend von der allgemeinen Vorschrift aus Ethanol kristallisiert und als Hydrochlorid erhalten.

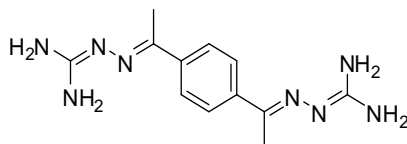
Ausbeute: 1,10 g (75,3 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 29,5 % B; DC: R_f 0,85; MS ber.: 176,11, MS gef.: 177,0 ($M+H$)⁺.

¹H-NMR: 400,0 MHz, DMSO-*d*₆ [ppm] = 2,33 (s, 3 H), 7,39 (m, 3 H, aromatisch), 7,83 (s, 3H), 7,92 (2d, 2 H), 11,31 (s, 1 H).

¹³C-NMR: 100,6 MHz, DMSO-*d*₆ [ppm] = 15,24 (CH₃), 127,26 (2 \times CH_{Ar}), 127,81 (2 \times CH_{Ar}), 130,21 (CH_{Ar}), 137,38 (C_{Ar}), 152,10 (C_{Ar}-C=N), 156,66 (N-C=N).

MI-0301 (2E,2'E)-2,2'-(1,1'-(1,4-Phenyl)-bis(ethan-1-yl-1-yliden))-bis(diaminomethylenhydrazon) \times 2 TFA

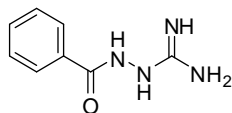


1,0 g (6,17 mmol) 1,4-Diacetylbenzol wurde nach Vorschrift B umgesetzt. Von dem Rohprodukt wurden lediglich 0,4 g über präparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0,25 g, weißer Feststoff.

HPLC: 24,2 % B; DC: R_f 0,78; MS ber.: 274,17, MS gef.: 549,0 (2M+H)⁺.

MI-0302 2-Benzoylhydrazincarboximidamid

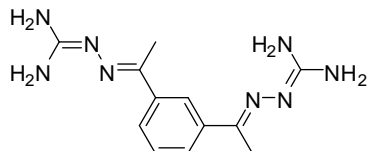


1,0 g (7,11 mmol) Benzoesäurechlorid wurde nach Vorschrift F umgesetzt.

Ausbeute: 0,26 g (20,7 % der Theorie), gelber Feststoff.

HPLC: 16,6 % B; DC: R_f 0,86; MS ber.: 178,09, MS gef.: 357,0 (2M+H)⁺.

MI-0303 (2E,2'E)-2,2'-(1,1'-(1,3-Phenyl)-bis(ethan-1-yl-1-yliden))-bis(diaminomethylenhydrazon) \times 2 TFA



0,5 g (3,08 mmol) 1,3-Diacetylbenzol wurden nach Vorschrift B umgesetzt. Von dem Rohprodukt wurden lediglich 0,25 g mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0,05 g, weißer Feststoff.

HPLC: 24,6 % B; DC: R_f 0,80; MS ber.: 274,17, MS gef.: 275,11 ($M+H$)⁺.

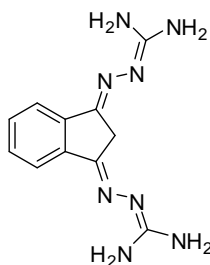
Ausbeute: 0,86 g (36,5 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 21,8 % B; DC: R_f 0,77; MS ber.: 246,13, MS gef.: 247,04 (M+H)⁺.

¹H-NMR: 400,0 MHz, DMSO-*d*₆ [ppm] = 7,90 (s, 8 H), 8,17 (2d, 4 H), 12,20 (s, 2 H).

¹³C-NMR: 100,6 MHz, DMSO-*d*₆ [ppm] = 128,34 (4 × C_{Ar}), 135,69 (2 × C_{Ar}), 146,51 (2 × C_{Ar}-C=N), 156,00 (2 × N-C=N).

MI-0308 1,3-Indandion-bisdiaminomethylenhydrazon × 2 HCl

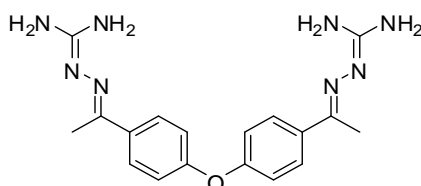


0,5 g (3,42 mmol) 1,3-Indandion wurden nach Vorschrift B umgesetzt und abweichend von der allgemeinen Vorschrift aus Ethanol kristallisiert und als Hydrochlorid erhalten.

Ausbeute: 0,82 g (72,6 % der Theorie), gelber Feststoff.

HPLC: 20,8 % B; DC: R_f 0,78; MS ber.: 258,13, MS gef.: 259,01 (M+H)⁺.

MI-0309 (2E,2'E)-2,2'-(4,4'-Diphenylether-bis(ethan-1-yl-1-yliden))-bis(diaminomethylenhydrazon) × 2 HCl

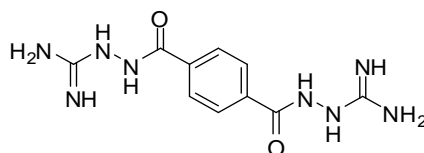


0,75 g (2,9 mmol) des Intermediats **1** wurden nach Vorschrift B umgesetzt und abweichend von der allgemeinen Vorschrift aus Ethanol kristallisiert und als Hydrochlorid erhalten.

Ausbeute: 0,94 g (88,4 % der Theorie), bräunlicher Feststoff.

HPLC: 35,4 % B; DC: R_f 0,81; MS ber.: 366,19, MS gef.: 366,98 (M+H)⁺.

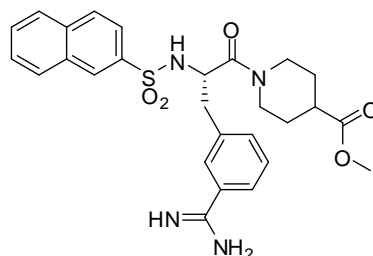
MI-0310 2,2'-Terephthaloyl-bis(hydrazincarboximidamid)



0,5 g (4,92 mmol) Terephthalsäuredichlorid wurden nach Vorschrift F umgesetzt.

Ausbeute: 0,24 g (34,7 % der Theorie), gelber Feststoff.

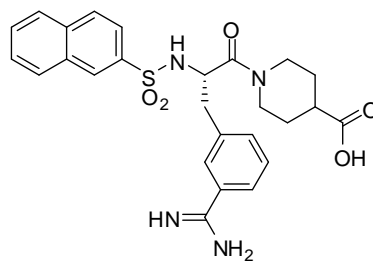
DC: R_f 0,63; MS ber.: 278,12, MS gef.: 278,93 (M+H)⁺.

MI-0311 β -Nas-Phe(3-Amidino)-iNip-OMe \times TFA (Stürzebecher et al., 1995)

0,17 g (0,315 mmol) des Intermediats **49** wurden nach Vorschrift K umgesetzt. Es wurde jedoch nur die Hälfte des Rohprodukts präparativ gereinigt. Die andere Hälfte wurde direkt zu **MI-0312** verseift.

Ausbeute: 70 mg (70,0 % der Theorie), weißer Feststoff.

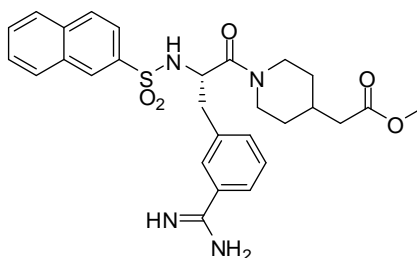
HPLC: 42,2 % B; DC: R_f 0,89; MS ber.: 522,19, MS gef.: 523,1 (M+H)⁺.

MI-0312 β -Nas-Phe(3-Amidino)-iNip-OH \times TFA (Stürzebecher et al., 1995)

0,157 mmol des Rohprodukts von **MI-0311** wurden nach Vorschrift I verseift.

Ausbeute: 39 mg (39,9 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 36,2 % B; DC: R_f 0,81; MS ber.: 508,19, MS gef.: 509,08 (M+H)⁺.

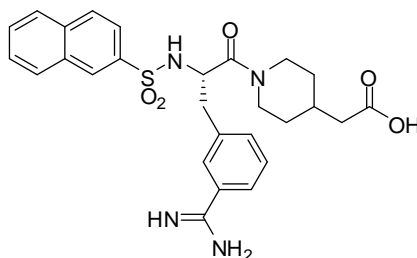
MI-0313 β -Nas-Phe(3-Amidino)-Pip(4-Essigsäuremethylester) \times TFA

0,22 g (0,398 mmol) des Intermediats **50** wurden nach Vorschrift K umgesetzt. Es wurde jedoch nur die Hälfte des Rohprodukts präparativ gereinigt. Die andere Hälfte wurde direkt zu Inhibitor **MI-0314** verseift.

Ausbeute: 74 mg (65,4 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 43,1 % B; DC: R_f 0,88; MS ber.: 536,21, MS gef.: 537,11 (M+H)⁺.

MI-0314 β -Nas-Phe(3-Amidino)-Pip(4-Essigsäure) \times TFA

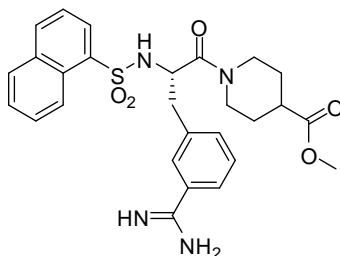


0,199 mmol des Rohprodukts von **MI-0313** wurden nach Vorschrift I verseift.

Ausbeute: 51 mg (40,2 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 37,4 % B; DC: R_f 0,82; MS ber.: 522,19, MS gef.: 523,11 ($M+H$)⁺.

MI-0315 α -Nas-Phe(3-Amidino)-iNip-OMe \times TFA

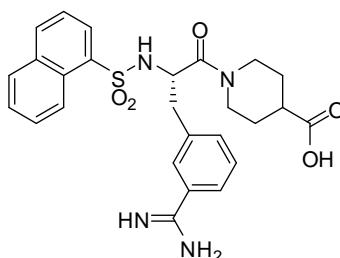


0,32 g (0,59 mmol) des Intermediats **48** wurden nach Vorschrift K umgesetzt. Es wurde jedoch nur die Hälfte des Rohprodukts präparativ gereinigt. Die andere Hälfte wurde direkt zu Inhibitor **MI-0316** verseift.

Ausbeute: 30 mg (15,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 40,3 % B; DC: R_f 0,88; MS ber.: 522,19, MS gef.: 523,3 ($M+H$)⁺.

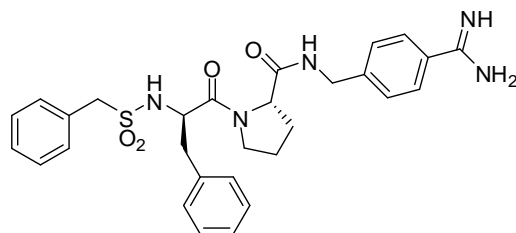
MI-0316 α -Nas-Phe(3-Amidino)-iNip-OH \times TFA



0,295 mmol des Rohprodukts von **MI-0315** wurden nach Vorschrift I verseift.

Ausbeute: 25 mg (13,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

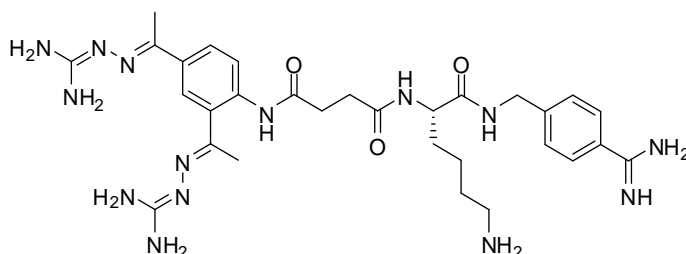
HPLC: 35,5 % B; DC: R_f 0,79; MS ber.: 508,18, MS gef.: 509,3 ($M+H$)⁺.

MI-0317 Bzls-D-Phe-Pro-4-Amidinobenzylamid × TFA

0,25 g (0,78 mmol) des Intermediats **55** und 0,24 g (0,78 mmol) des Intermediats **70** wurden nach Vorschrift D gekoppelt.

Ausbeute: 0,23 g (45,0 % der Theorie), weißer Feststoff.

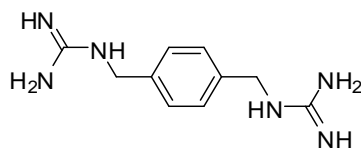
HPLC: 44,2 % B; DC: R_f 0,91; MS ber.: 547,22, MS gef.: 548,14 (M+H)⁺.

MI-0318 (2E,2'E)-2,2'-((3,5-bis(Ethan-1-yl-1-yliden))-bis(diaminomethylenhydrazon))Anilin-Succinyl-Lys-4-Amidinobenzylamid × 4 TFA

54 mg (0,059 mmol) des Inhibitors **MI-0333** wurden in 15 mL Methanol und 2 mL Essigsäure gelöst. Nach Zugabe von 6 mg Pd/C und 15 mg Ammoniumformat wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 20 mg (37,7 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 21,8 % B; MS ber.: 648,37 MS gef.: 325,0 (M+2H)⁺⁺/2.

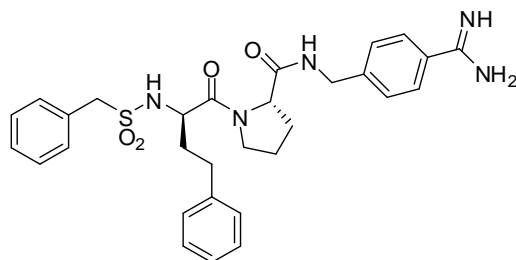
MI-0319 1,1'-(1,4-Phenyl-bis(methylen))diguanidin × 2 HCl

0,3 g (1,44 mmol) 4-Aminomethylenbenzylamin × 2 HCl wurden in Wasser gelöst und mit 0,63 g (4,5 mmol) 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin × HCl (Bernatowicz et al., 1992) versetzt. Mit 1 M NaOH wird der pH-Wert auf 7 eingestellt und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum teilweise entfernt. Das Produkt kristallisierte im Kühlschrank nadelförmig aus. Es wurde abgesaugt und mit kaltem Methanol (50 %) mehrfach gewaschen.

Ausbeute: 70 mg (23,3 % der Theorie), farbloser Feststoff.

DC: R_f 0,78; MS ber.: 220,14, MS gef.: 111,02 (M+2H)⁺⁺/2.

MI-0320 Bzls-D-hPhe-Pro-4-Amidinobenzylamid × TFA

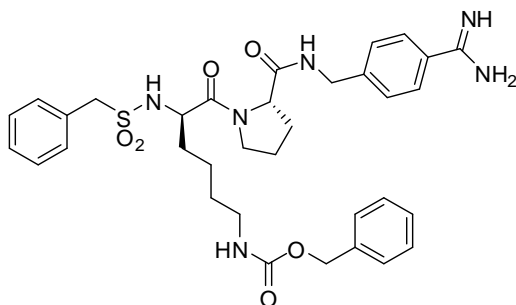


0,41 g (1,24 mmol) des Intermediats **56** und 0,39 g (1,24 mmol) des Intermediats **70** wurden nach Vorschrift D gekoppelt. Die geringe Ausbeute dieser Reaktion ist die Folge des Bruchs von Glasgeräten am Feinvakuum.

Ausbeute: 10 mg (1,1 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 46,2 % B; DC: R_f 0,87; MS ber.: 561,2, MS gef.: 562,08 (M+H)⁺.

MI-0321 Bzls-D-Lys(Cbz)-Pro-4-Amidinobenzylamid × TFA

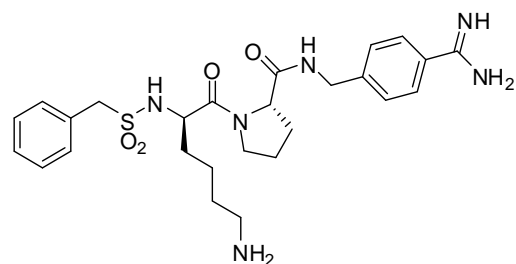


0,2 g (0,46 mmol) des Intermediats **57** und 0,15 g (0,46 mmol) des Intermediats **70** wurden nach Vorschrift D gekoppelt.

Ausbeute: 0,15 g (42,0 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 46,9 % B; DC: R_f 0,90; MS ber.: 662,29, MS gef.: 663,3 (M+H)⁺.

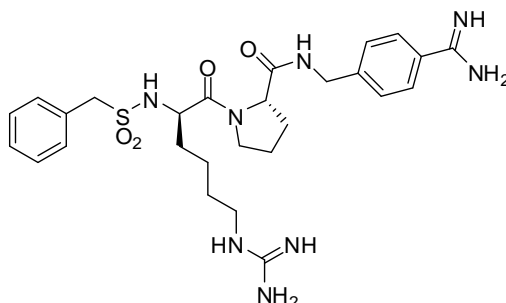
MI-0322 Bzls-D-Lys-Pro-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA



0,13 g (0,16 mmol) des gereinigten Inhibitors **MI-0321** wurden in 20 mL 90 % HAc gelöst, mit 10 mol% Pd/C versetzt und zwei Tage bei Raumtemperatur unter H₂-Atmosphäre hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Das Lösungsmittel der produkthaltigen Fraktionen wurde im Vakuum entfernt und das Produkt aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 50 mg (82,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

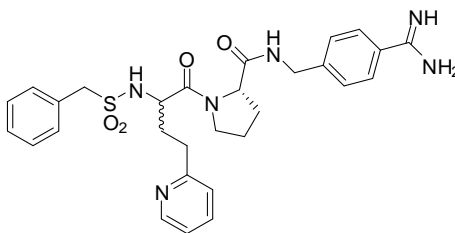
HPLC: 28,2 % B; MS ber.: 528,25, MS gef.: 529,1 (M+H)⁺.

MI-0323 Bzls-D-hArg-Pro-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA

70 mg (0,08 mmol) des Inhibitors **MI-0322** wurden in 3 mL DMF gelöst und mit 35 mg 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin (Bernatowicz et al., 1992) versetzt. Nach Zugabe von 0,5 mL (2,87 mmol) DIPEA wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in kaltem Diethylether gefällt, das Produkt aus dem Präzipitat präparativ mittels HPLC aufgereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 28 mg (45,0 % der Theorie), weißer Feststoff.

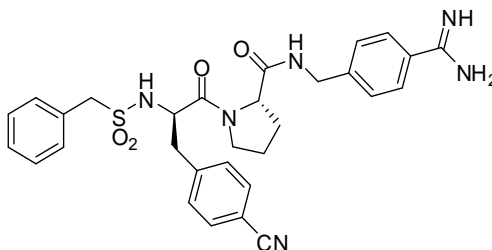
HPLC: 30,0 % B; DC: R_f 0,80; MS ber.: 570,27, MS gef.: 571,1 (M+H)⁺.

MI-0326 Bzls-D,L-hAla(2Pyr)-Pro-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA

90 mg (0,03 mmol) des Intermediats **58** und 90 mg (0,03 mmol) des Intermediats **70** wurden nach Vorschrift D gekoppelt.

Ausbeute: 79 mg (35,0 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 27,2 % B; DC: R_f 0,87; MS ber.: 562,24, MS gef.: 563,3 (M+H)⁺.

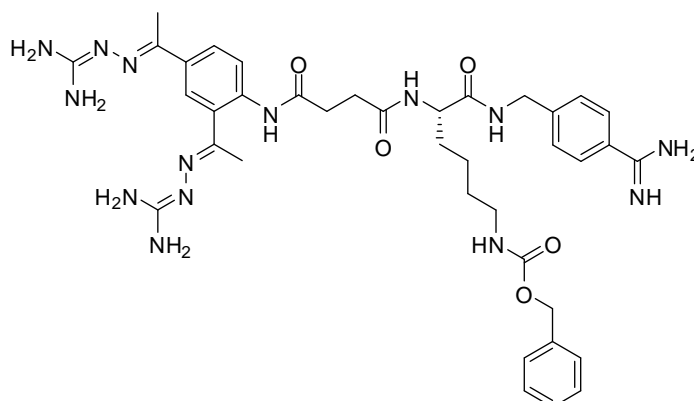
MI-0327 Bzls-D-Phe(4-CN)-Pro-4-Amidinobenzylamid × TFA

0,46 g (1,33 mmol) des Intermediats **59** und 0,42 g (1,33 mmol) des Intermediats **70** wurden nach Vorschrift D gekoppelt.

Ausbeute: 83 mg (9,1 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 40,8 % B; DC: R_f 0,91; MS ber.: 572,22 MS gef.: 573,01 (M+H)⁺.

MI-0333 (2E,2'E)-2,2'-((3,5-bis(ethan-1-yl-1-yliden))-bis(diaminomethylenhydrazon))Anilin-Succinyl-Lys(Cbz)-4-Amidinobenzylamid × 3 TFA

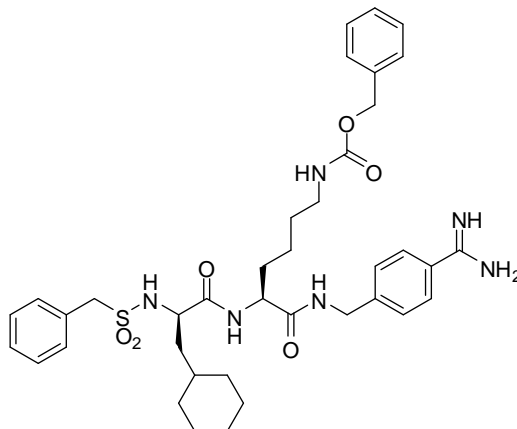


0,11 g (0,41 mmol) 4-(3,5-Diacetylphenyl)bernsteinsäureamid (Kar and Argade, 2002) und 0,3 g (0,41 mmol) des Intermediats **71** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und der Ansatz mittels präparativer HPLC aufgereinigt. 40 mg (0,06 mmol) dieses Zwischenprodukts wurden nach Vorschrift B umgesetzt und das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 54 mg (80,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 33,6 % B; MS ber.: 782,41 MS gef.: 783,6 (M+H)⁺.

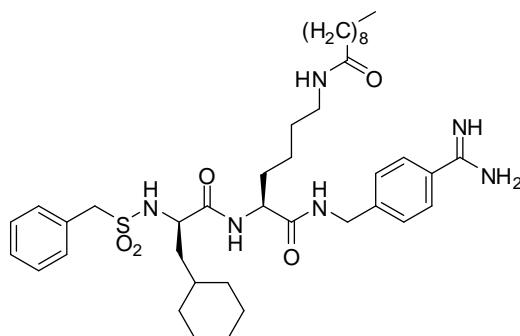
MI-0334 Bzls-D-Cha-Lys(Cbz)-4-Amidinobenzylamid × TFA



70 mg (0,2 mmol) Bzls-D-Cha-OH (Sisay et al., 2010) und 0,15 g (0,22 mmol) des Intermediats **71** wurden nach Vorschrift C gekoppelt. Die Hälfte der Mutterlauge wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, der andere Teil wurde zu Inhibitor **MI-0335** umgesetzt.

Ausbeute: 50 mg (59,2 % der Theorie), weißer Feststoff.

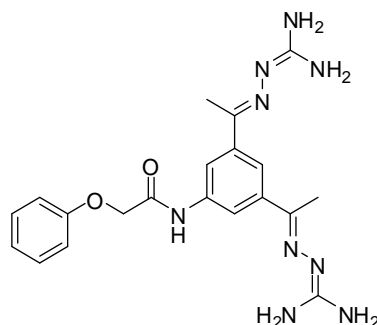
HPLC: 53,1 % B; DC: R_f 0,94; MS ber.: 718,35, MS gef.: 719,3 (M+H)⁺.

MI-0335 Bzls-D-Cha-Lys(Dec)-4-Amidinobenzylamid × TFA

90 mg des Rohprodukts von **MI-0334** wurden mit 1,5 mL HBr in HAc versetzt und eineinhalb Stunden stehen gelassen. Das Produkt wurde in kalten Diethylether gefällt und der Rückstand im Feinvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde nach Vorschrift C an Decansäure gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 22 mg (25,8 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 58,6 % B; DC: R_f 0,95; MS ber.: 738,45, MS gef.: 740,1 (M+H)⁺.

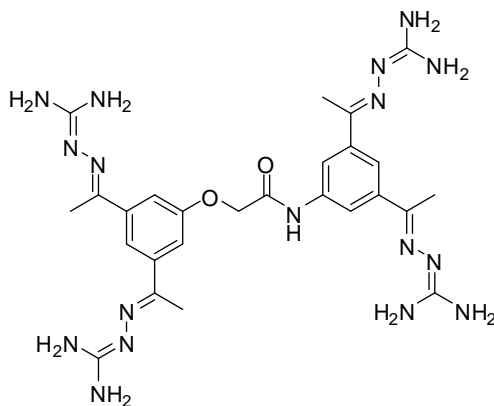
MI-0339 N-(3,5-bis((E)-1-((Diaminomethylen)hydrazino)ethyl)phenyl)-2-phenoxyacetamid × 2 TFA

0,1 g (0,32 mmol) des Intermediats **5** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 80 mg (38,3 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 35,9 % B; DC: R_f 0,86; MS ber.: 423,21, MS gef.: 424,18 (M+H)⁺.

MI-0342 **2-(3,5-bis((E)-1-((Diaminomethylen)hydrazono)ethyl)phenoxy)-N-(3,5-bis((E)-1-((diaminomethylen)hydrazono)ethyl)phenyl)acetamid**
× 4 TFA

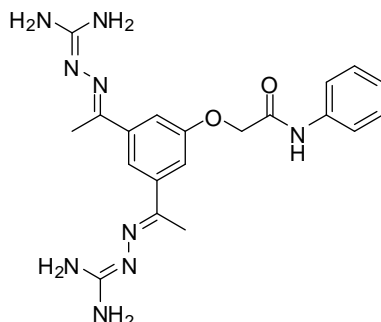


70 mg (0,18 mmol) des Intermediats **6** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 8,0 mg (4,2 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 32,1 % B; MS ber.: 619,33, MS gef.: 620,4 (M+H)⁺.

MI-0343 **2-(3,5-bis((E)-1-((Diaminomethylen)hydrazono)ethyl)phenoxy)-N-phenylacetamid**
× 2 TFA

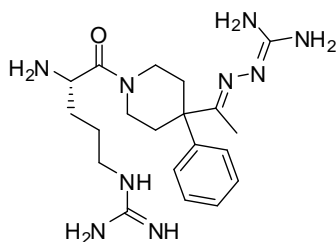


15 mg (0,05 mmol) des Intermediats **7** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 11 mg (34,3 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 34,1 % B; DC: R_f 0,87; MS ber.: 423,21, MS gef.: 424,1 (M+H)⁺.

MI-0344 **H-Arg-(4-(1-((Diaminomethylen)hydrazono)ethyl)-4-phenyl)-piperidin**
× 3 TFA

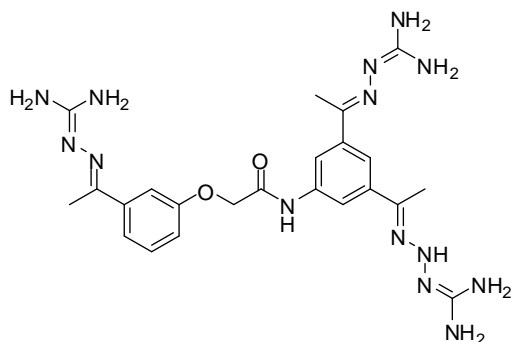


0,15 g (0,25 mmol) des Intermediats **31** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 60 mg (31,0 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 27,0 % B; DC: R_f 0,74; MS ber.: 415,28, MS gef.: 416,35 (M+H)⁺.

MI-0345 **2-(3-((E)-1-((Diaminomethylen)hydrazono)ethyl)phenoxy)-N-(3,5-bis((E)-1-((diaminomethylen)hydrazono)ethyl)phenyl)acetamid × 3 TFA**

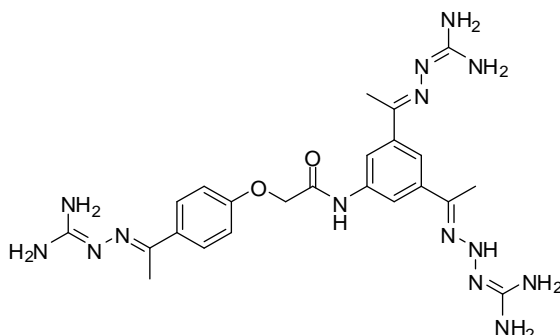


50 mg (0,14 mmol) des Intermediats **8** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 27 mg (22,1 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 32,0 % B; DC: R_f 0,81; MS ber.: 521,27, MS gef.: 522,37 (M+H)⁺.

MI-0346 **2-(4-((E)-1-((Diaminomethylen)hydrazono)ethyl)phenoxy)-N-(3,5-bis((E)-1-((diaminomethylen)hydrazono)ethyl)phenyl)acetamid × 3 TFA**

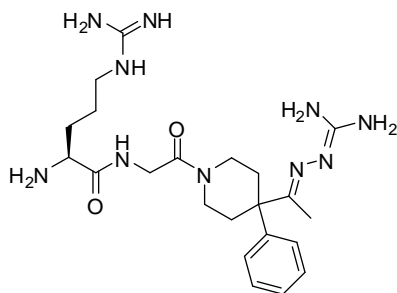


80 mg (0,23 mmol) des Intermediats **9** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 41 mg (20,7 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 31,2 % B; DC: R_f 0,80; MS ber.: 521,27, MS gef.: 522,1 (M+H)⁺.

MI-0347 **H-Gly-Arg-(4-(1-((Diaminomethylen)hydrazono)ethyl)-4-phenyl)-piperidin × 3 TFA**

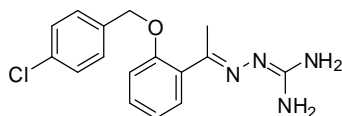


0,17 g (0,26 mmol) des Intermediats **35** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,14 g (66,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 25,4 % B; DC: R_f 0,73; MS ber.: 472,3, MS gef.: 473,5 (M+H)⁺.

MI-0348 (E)-2-(1-(2-(4-Chlorobenzyloxy)phenyl)ethyliden)diaminomethylenhydrazon × TFA

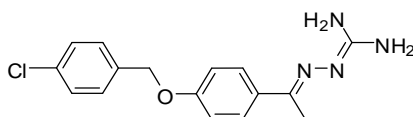


1,0 g (entsprechend maximal 1,83 mmol) des Intermediats **10** wurde nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,16 g (20,2 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 47,3 % B; DC: R_f 0,93; MS ber.: 316,11, MS gef.: 316,9 (M+H)⁺.

MI-0349 (E)-2-(1-(4-(4-Chlorobenzyloxy)phenyl)ethyliden)diaminomethylenhydrazon × TFA

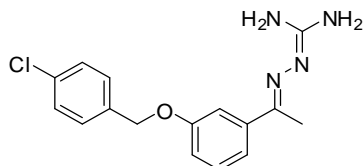


0,25 g (entsprechend maximal 0,96 mmol) des Intermediats **11** wurden nach Vorschrift B umgesetzt, jedoch nur ein Teil der Mutterlauge mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0,1 g, weißer Feststoff.

HPLC: 53,5 % B; DC: R_f 0,93; MS ber.: 316,11, MS gef.: 317,0 (M+H)⁺.

MI-0350 (E)-2-(1-(3-(4-Chlorobenzyloxy)phenyl)ethyliden)diaminomethylenhydrazon × TFA

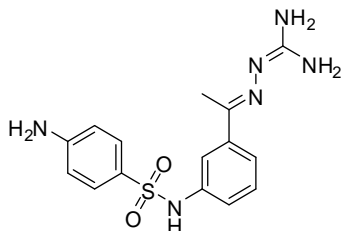


0,61 g (entsprechend maximal 1,83 mmol) des Intermediats **12** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,28 g (59,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 52,1 % B; DC: R_f 0,91; MS ber.: 316,11, MS gef.: 317,0 (M+H)⁺.

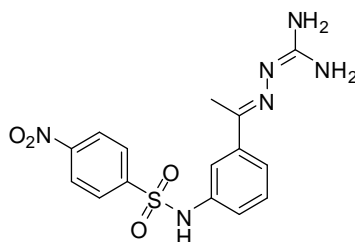
MI-0351 (E)-N-(3-(1-((Diaminomethylen)hydrazono)ethyl)phenyl)-4-aminobenzolsulfonamid × 2 TFA



0,15 g (0,52 mmol) des Intermediats **28** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 90 mg (51,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

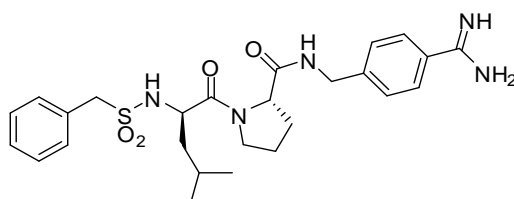
HPLC: 31,2 % B; DC: R_f 0,86; MS ber.: 346,12, MS gef.: 347,1 (M+H)⁺.

MI-0352 (E)-N-(3-(1-((Diaminomethylen)hydrazono)ethyl)phenyl)-4-nitrobenzolsulfonamid × TFA

0,1 g (0,24 mmol) des Intermediats **29** und 0,15 g (0,68 mmol) *para*-Nitrophenylsulfonsäurechlorid wurden in 5 mL trockenem DCM gelöst. Dem Ansatz wurden 120 µL (0,68 mmol) DIPEA hinzugefügt und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt als TFA-Salz aus 80 % *tert*.-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 30 mg (25,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

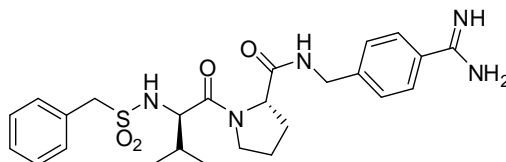
HPLC: 31,3 % B; DC: R_f 0,90; MS ber.: 376,1, MS gef.: 377,16 (M+H)⁺.

MI-0353 Bzls-D-Leu-Pro-4-Amidinobenzylamid × TFA

0,1 g (0,35 mmol) des Intermediats **65** und 0,12 g (0,38 mmol) des Intermediats **70** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 90 mg (41,4 % der Theorie), weißer Feststoff.

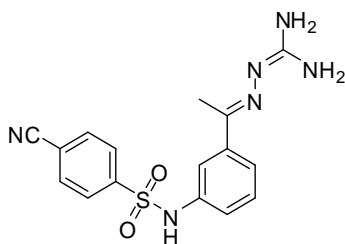
HPLC: 40,2 % B; DC: R_f 0,93; MS ber.: 513,24, MS gef.: 514,39 (M+H)⁺.

MI-0354 Bzls-D-Val-Pro-4-Amidinobenzylamid × TFA

0,1 g (0,37 mmol) des Intermediats **64** und 0,13 g (0,4 mmol) des Intermediats **70** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

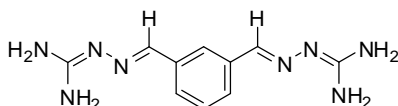
Ausbeute: 60 mg (26,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 36,8 % B; DC: R_f 0,92; MS ber.: 499,23, MS gef.: 500,32 (M+H)⁺.

MI-0355 (E)-N-(3-(1-((Diaminomethylen)hydrazono)ethyl)phenyl)-4-cyanobenzolsulfonamid × TFA

0,1 g (0,24 mmol) des Intermediats **29** und 0,14 g (0,68 mmol) *para*-Cyanophenylsulfonsäurechlorid wurden in 5 mL trockenem DCM gelöst. Dem Ansatz wurden 120 µL (0,68 mmol) DIPEA hinzugefügt und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt als TFA-Salz aus 80 % *tert*.-Butanol lyophilisiert. Ausbeute: 10 mg (8,9 % der Theorie), weißer Feststoff.

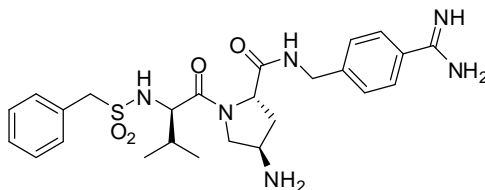
HPLC: 37,0 % B; MS ber.: 356,11, MS gef.: 357,07 (M+H)⁺.

MI-0356 (2E,2E')-2,2'-(1,3-Phenylene-bis(methan-1-yl-1-yliden))-bis(diaminomethylenhydrazon) × 2 TFA

0,5 g (3,7 mmol) Isophthalaldehyd wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,16 g (9 % der Theorie), weißer Feststoff.

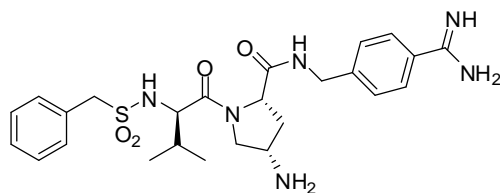
HPLC: 22,7 % B; MS ber.: 246,13, MS gef.: 247,21 (M+H)⁺.

MI-0357 Bzls-D-Val-Pro(R-4-Amino)-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA

90 mg (0,18 mmol) des Intermediats **66** und 42 mg (0,19 mmol) 4-Amidinobenzylamin × 2 HCl wurden nach Vorschrift C gekoppelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Ansatz vor der präparativen Aufreinigung mittels HPLC für eine Stunde mit 90 % TFA behandelt.

Ausbeute: 10 mg (7,5 % der Theorie), weißer Feststoff.

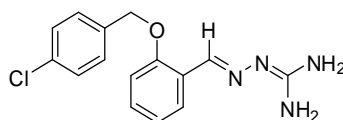
HPLC: 25,5 % B; DC: R_f 0,81; MS ber.: 514,24, MS gef.: 515,24 (M+H)⁺.

MI-0358 Bzls-D-Val-Pro(S-4-Amino)-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA

85 mg (0,165 mmol) des Intermediats **67** und 40 mg (0,18 mmol) 4-Amidinobenzylamin × 2 HCl wurden nach Vorschrift C gekoppelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Ansatz vor der präparativen Aufreinigung mittels HPLC für eine Stunde mit 90 % TFA behandelt.

Ausbeute: 11 mg (9,0 % der Theorie), weißer Feststoff.

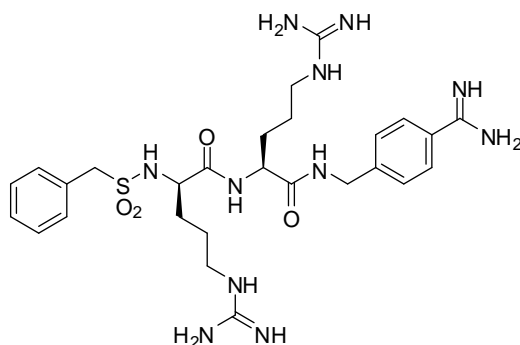
HPLC: 25,2 % B; DC: R_f 0,82; MS ber.: 514,24, MS gef.: 515,24 (M+H)⁺.

MI-0359 (E)-2-(2-(4-Chlorbenzyloxy)benzyliden)diaminomethylenhydrazon × TFA

0,57 g (entspricht maximal 2,05 mmol) des Intermediats **13** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,57 g (66,4 % der Theorie), weißer Feststoff.

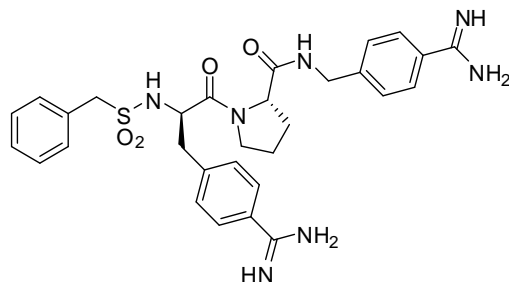
HPLC: 48,1 % B; DC: R_f 0,90; MS ber.: 302,09, MS gef.: 302,89 (M+H)⁺.

MI-0360 Bzls-D-Arg-Arg-4-Amidinobenzylamid × 3 TFA

0,15 g (0,19 mmol) des Intermediats **62** und 80 mg (0,21 mmol) des Intermediats **72** wurden nach Vorschrift C gekoppelt. Abweichend von der allgemeinen Vorschrift wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand über Nacht mit 90 % TFA behandelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Öl in 90 % HAc aufgenommen und unter H₂-Atmosphäre mit Pd/C als Katalysator für zwei Tage hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 40 mg (22,0 % der Theorie), weißer Feststoff.

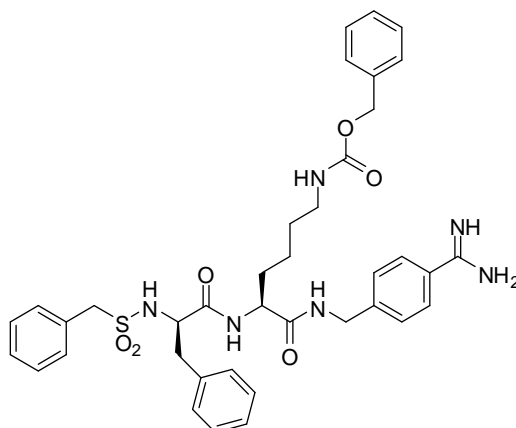
HPLC: 23,2 % B; DC: R_f 0,78; MS ber.: 615,31, MS gef.: 616,3 (M+H)⁺.

MI-0361 Bzls-D-Phe(4-Amidino)-Pro-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA

0,4 g (0,95 mmol) des Intermediats **61** und 0,30 g (0,95 mmol) des Intermediats **70** wurden nach Vorschrift C gekoppelt. Abweichend von der allgemeinen Vorschrift wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 90 % HAc aufgenommen. Der Ansatz wurde mit Pd/C als Katalysator 24 Stunden unter H₂-Atmosphäre bei Raumtemperatur hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt. Das Produkt wurde aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 0,16 g (20,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

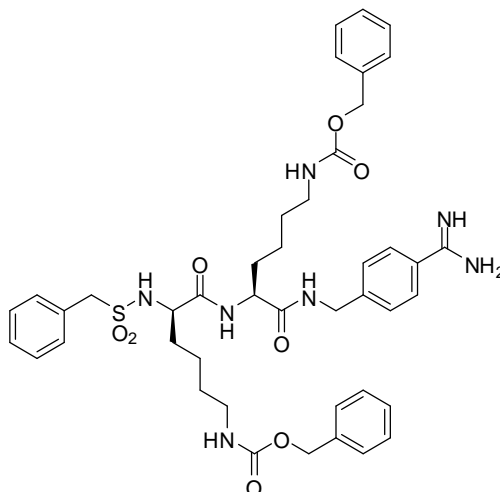
HPLC: 28,6 % B; DC: R_f 0,76; MS ber.: 589,25, MS gef.: 590,2 (M+H)⁺.

MI-0362 Bzls-D-Phe-Lys(Cbz)-4-Amidinobenzylamid × TFA

0,15 g (0,47 mmol) des Intermediats **55** und 0,38 g (0,47 mmol) des Intermediats **71** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 0,25 g (63,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

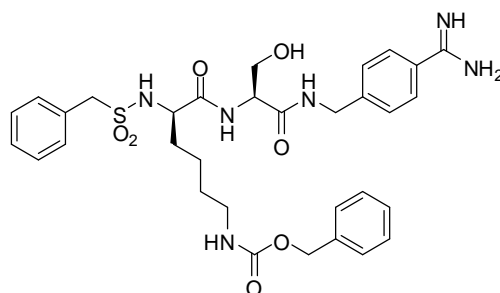
HPLC: 50,1 % B; DC: R_f 0,93; MS ber.: 712,3, MS gef.: 713,3 (M+H)⁺.

MI-0363 Bzls-D-Lys(Cbz)-Lys(Cbz)-4-Amidinobenzylamid × TFA

0,15 g (0,35 mmol) des Intermediats **57** und 0,28 g (0,35 mmol) des Intermediats **71** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 0,32 g (98,4 % der Theorie), weißer Feststoff.

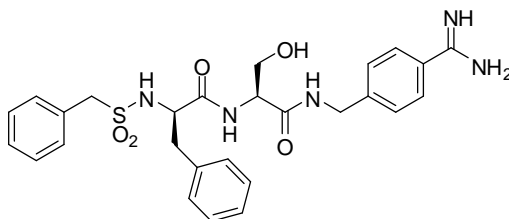
HPLC: 52,6 % B; DC: R_f 0,93; MS ber.: 827,37, MS gef.: 828,4 (M+H)⁺.

MI-0364 Bzls-D-Lys(Cbz)-Ser-4-Amidinobenzylamid × TFA

0,15 g (0,35 mmol) des Intermediats **57** und 0,16 g (0,35 mmol) des Intermediats **73** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 60 mg (21,9 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 41,3 % B; DC: R_f 0,88; MS ber.: 652,27, MS gef.: 653,3 (M+H)⁺.

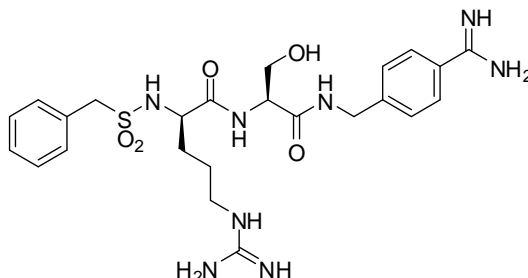
MI-0365 Bzls-D-Phe-Ser-4-Amidinobenzylamid × TFA

50 mg (0,16 mmol) des Intermediats **55** und 70 mg (0,16 mmol) des Intermediats **73** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 13 mg (12,8 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 36,7 % B; DC: R_f 0,88; MS ber.: 537,2, MS gef.: 538,0 (M+H)⁺.

MI-0366 Bzls-D-Arg-Ser-4-Amidinobenzylamid × TFA

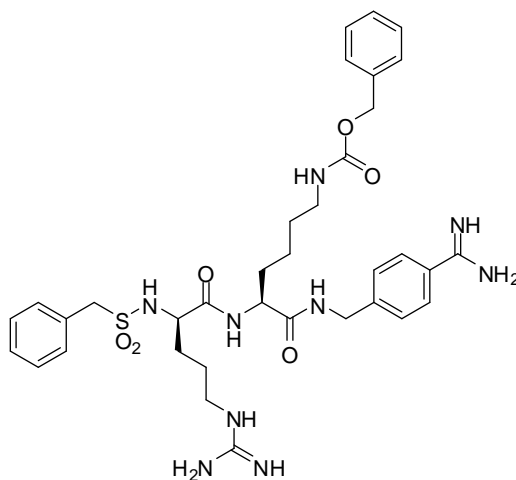


50 mg (0,13 mmol) des Intermediats **62** und 60 mg (0,13 mmol) des Intermediats **73** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt. Das Lösungsmittel der produkthaltigen Fraktionen wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 90 % HAc aufgenommen. Nach Zugabe von 10 mol% Pd/C wurde unter H₂-Atmosphäre für zwei Tage bei Raumtemperatur hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 16 mg (16 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 21,7 % B; DC: R_f 0,79; MS ber.: 546,24, MS gef.: 547,3 (M+H)⁺.

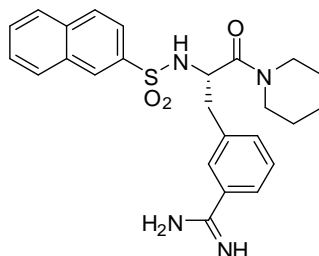
MI-0367 Bzls-D-Arg-Lys(Cbz)-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA



0,1 g (0,27 mmol) des Intermediats **63** und 0,18 g (0,27 mmol) des Intermediats **71** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 45 mg (12,8 % der Theorie), weißer Feststoff.

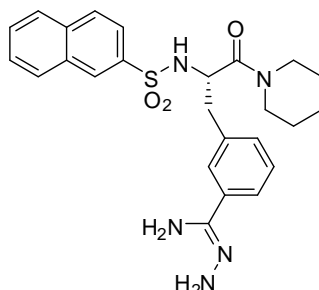
HPLC: 35,2 % B; DC: R_f 0,87; MS ber.: 721,34, MS gef.: 722,43 (M+H)⁺.

MI-0369 β -Nas-Phe(3-Amidino)-Pip \times TFA

Das gesamte farblose Öl des Intermediats **51** (maximal 0,67 mmol) wurde nach Vorschrift K umgesetzt.

Ausbeute: 0,13 g (33,2 % der Theorie), weißer Feststoff.

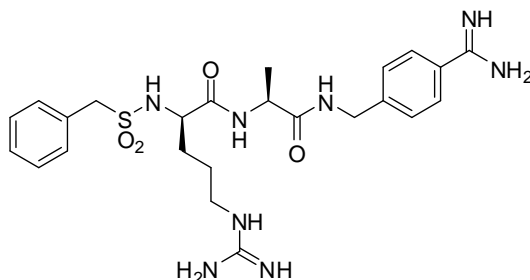
HPLC: 40,6 % B; DC: R_f 0,90; MS ber.: 464,19, MS gef.: 465,0 (M+H)⁺.

MI-0370 β -Nas-Phe(3-Amidrazono)-Pip \times TFA

Das gesamte Öl des Intermediats **54** (maximal 0,37 mmol) wurden in 100 mL ACN gelöst, mit 3 Äquivalenten Hydrazinhydrat versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Ansatz mit 5 % KHSO₄-Lösung aufgenommen. Es wurde zweimal mit EtOAc gewaschen und die Wasserphase mit 1 N NaOH stark alkalisch gemacht. Das Produkt wurde mit EtOAc extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Nach Entfernung des Lösungsmittels verblieb ein gelbes Öl, welches mittels präparativer HPLC aufgereinigt wurde. Das Produkt wurde aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 20 mg (8,9 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 42,1 % B; DC: R_f 0,90; MS ber.: 479,2, MS gef.: 480,0 (M+H)⁺.

MI-0371 Bzls-D-Arg-Ala-4-Amidinobenzylamid \times 2 TFA

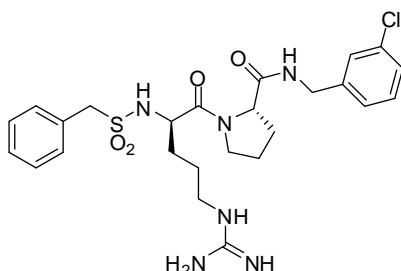
70 mg (0,19 mmol) des Intermediats **62** und 0,1 g (0,21 mmol) des Intermediats **74** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt über präparative HPLC gereinigt. Abweichend von der allgemeinen Vorschrift wurde nach Entfernung des Lösungsmittels der Rückstand in 90 % HAc aufgenommen. Nach Zugabe von 10 mol% Pd/C wurde der

Ansatz unter H₂-Atmosphäre für zwei Tage bei Raumtemperatur hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 80 mg (54,2 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 23,1 % B; DC: R_f 0,81; MS ber.: 530,24, MS gef.: 531,4 (M+H)⁺.

MI-0373 Bzls-D-Arg-Pro-3-Chlorbenzylamid × TFA

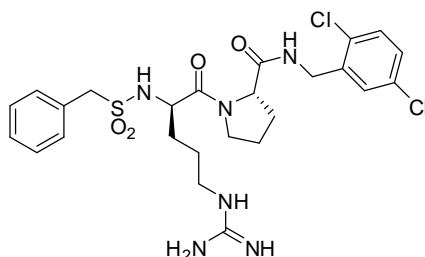


0,25 g (0,59 mmol) des Intermediats **69** und 90 mg (0,64 mmol) 3-Chlorbenzylamin wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0,11 g (28,2 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 43,7 % B; DC: R_f 0,90; MS ber.: 548,2, MS gef.: 549,01 (M+H)⁺.

MI-0374 Bzls-D-Arg-Pro-2,5-Dichlorbenzylamid × TFA

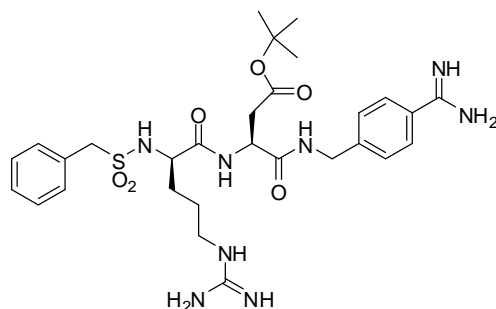


0,25 g (0,59 mmol) des Intermediats **69** und 0,11 g (0,64 mmol) 2,5-Dichlorbenzylamin wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 96 mg (23,5 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 46,1 % B; DC: R_f 0,90; MS ber.: 582,16, MS gef.: 583,08 (M+H)⁺.

MI-0375 Bzls-D-Arg-Asp(OtBu)-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA



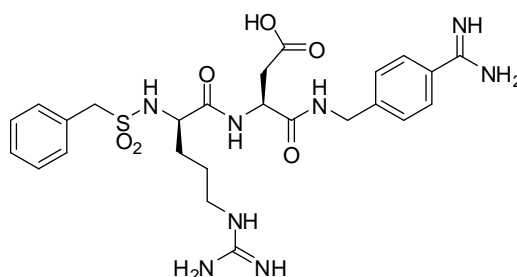
70 mg (0,19 mmol) des Intermediats **62** und 84 mg (0,215 mmol) des Intermediats **75** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und der Ansatz mittels präparativer HPLC gerei-

nigt. Abweichend von der allgemeinen Vorschrift wurde nach Entfernung des Lösungsmittels der Rückstand in MeOH aufgenommen. Nach Zugabe von 10 mol% Pd/C wurde der Ansatz unter H₂-Atmosphäre für zwei Tage bei Raumtemperatur hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 25,4 g (31,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 32,4 % B; DC: R_f 0,87; MS ber.: 630,29, MS gef.: 631,29 (M+H)⁺.

MI-0376 Bzls-D-Arg-Asp-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA

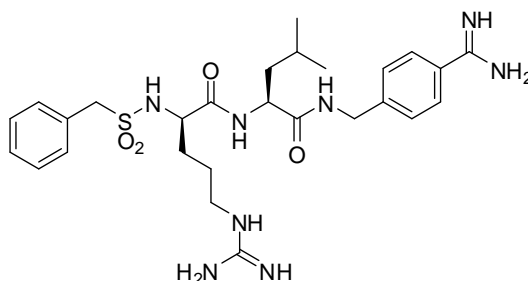


30 mg (0,045 mmol) des Inhibitors **MI-0375** wurden nach Vorschrift H behandelt. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 3,8 mg (5,06 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 23,7 % B; DC: R_f 0,70; MS ber.: 574,23, MS gef.: 575,27 (M+H)⁺.

MI-0377 Bzls-D-Arg-Leu-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA

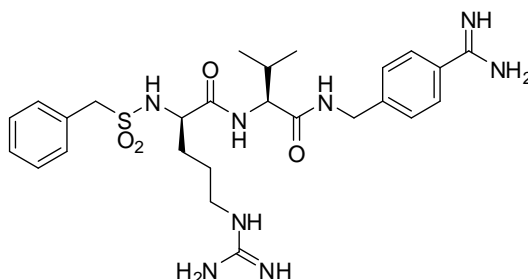


0,25 g (0,59 mmol) des Intermediats **63** und 90 mg (0,64 mmol) des Intermediats **77** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0,11 g (22,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 29,9 % B; DC: R_f 0,87; MS ber.: 572,29, MS gef.: 573,33 (M+H)⁺.

MI-0378 Bzls-D-Arg-Val-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA

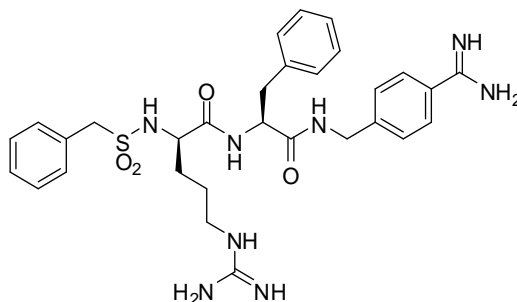


0,25 g (0,59 mmol) des Intermediats **63** und 90 mg (0,64 mmol) des Intermediats **76** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0,11 g (28,2 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 27,4 % B; DC: R_f 0,85; MS ber.: 558,27, MS gef.: 559,3 (M+H)⁺.

MI-0379 Bzls-D-Arg-Phe-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA

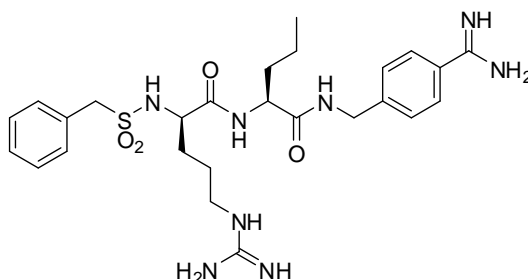


76,5 mg (0,21 mmol) des Intermediats **63** und 0,1 g (0,19 mmol) des Intermediats **79** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 33,3 mg (20,9 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 31,1 % B; DC: R_f 0,87; MS ber.: 606,27, MS gef.: 607,29 (M+H)⁺.

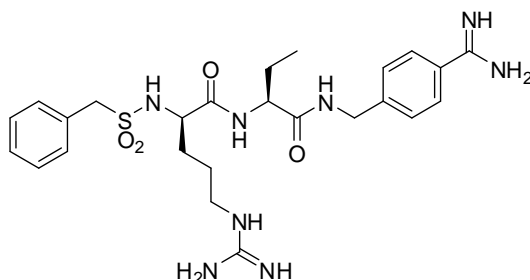
MI-0380 Bzls-D-Arg-Nva-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA



84,3 mg (0,23 mmol) des Intermediats **63** und 0,1 g (0,21 mmol) des Intermediats **81** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 31,6 mg (19,1 % der Theorie), weißer Feststoff.

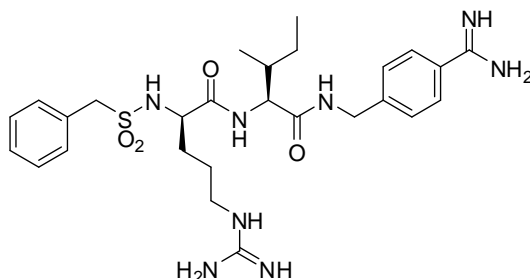
HPLC: 28,1 % B; DC: R_f 0,85; MS ber.: 558,27, MS gef.: 559,05 (M+H)⁺.

MI-0381 Bzls-D-Arg-Abu-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA

86,8 mg (0,24 mmol) des Intermediats **63** und 0,1 g (0,22 mmol) des Intermediats **80** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 27,7 mg (16,7 % der Theorie), weißer Feststoff.

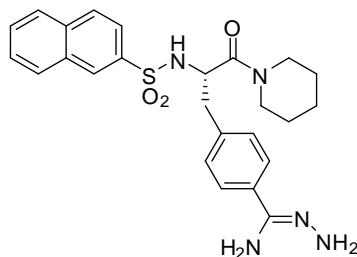
HPLC: 25,7 % B; DC: R_f 0,83; MS ber.: 544,26, MS gef.: 273,26 ($M+2H$)⁺⁺/2.

MI-0382 Bzls-D-Arg-Ile-4-Amidinobenzylamid × 2 TFA

0,11 g (0,29 mmol) des Intermediats **63** und 0,15 g (0,29 mmol) des Intermediats **78** wurden nach Vorschrift C gekoppelt und das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 31 mg (13,0 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 29,7 % B; DC: R_f 0,85; MS ber.: 572,29, MS gef.: 287,25 ($M+2H$)⁺⁺/2.

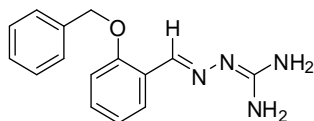
MI-0383 β-Nas-Phe(4-Amidrazono)-Pip × TFA

23 mg (0,042 mmol) des Intermediats **52** wurden in 15 mL ACN gelöst, mit sechs Äquivalenten Hydrazinhydrat versetzt und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Ansatz mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Das Produkt wurde aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 11 mg (54,6 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 41,6 % B; DC: R_f 0,88; MS ber.: 479,2, MS gef.: 480,29 ($M+H$)⁺.

MI-0384 (E)-2-(2-Benzoyloxybenzyliden)diaminomethylenhydrazon × TFA

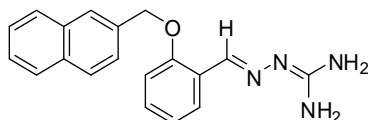


0,7 g (3,3 mmol) des Intermediats **15** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,58 g (46 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 44,2 % B; DC: R_f 0,88; MS ber.: 268,13, MS gef.: 269,04 (M+H)⁺.

MI-0385 (E)-2-(2-(Naphthalen-2-yl-methoxy)benzyliden)-diaminomethylenhydrazon × TFA

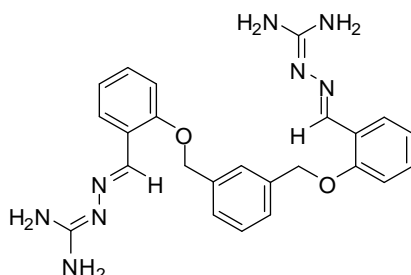


0,87 g (3,3 mmol) des Intermediats **18** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,80 g (56 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 51,1 % B; DC: R_f 0,87; MS ber.: 318,15, MS gef.: 319,08 (M+H)⁺.

MI-0386 (2E,2'E)-(1,3-Phenyl-bis(methoxy))-bis(phenyl-2-methan-1-yl-1-yliden)-2,2'-bis(diaminomethylenhydrazon) × 2 TFA

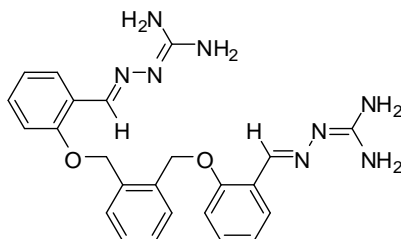


0,39 g (1,14 mmol) des Intermediats **25** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,40 g (52 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 42,9 % B; DC: R_f 0,84; MS ber.: 458,22, MS gef.: 459,2 (M+H)⁺.

MI-0387 (2E,2'E)-(1,2-Phenyl-bis(methoxy))-bis(phenyl-2-methan-1-yl-1-yliden)-2,2'-bis(diaminomethylenhydrazon) × 2 TFA

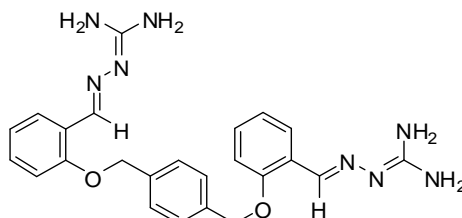


0,30 g (0,86 mmol) des Intermediats **26** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,28 g (48 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 41,2 % B; DC: R_f 0,85; MS ber.: 458,22, MS gef.: 459,2 (M+H)⁺.

MI-0388 (2E,2'E)-(1,4-Phenyl-bis(methoxy))-bis(phenyl-2-methan-1-yl-1-yliden)-2,2'-bis(diaminomethylenhydrazon) × 2 TFA

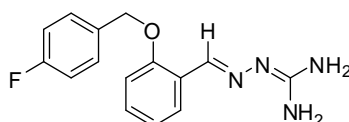


0,60 g (1,73 mmol) des Intermediats **24** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,47 g (40 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 44,0 % B; DC: R_f 0,84; MS ber.: 458,22, MS gef.: 459,19 (M+H)⁺.

MI-0389 (E)-2-(2-(4-Fluorobenzyloxy)benzyliden)diaminomethylenhydrazon × TFA

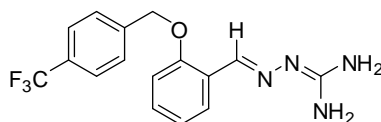


0,465 g (2,0 mmol) des Intermediats **19** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,28 g (35 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 45,0 % B; DC: R_f 0,87; MS ber.: 286,12, MS gef.: 287,0 (M+H)⁺.

MI-0390 (E)-2-(2-(4-Trifluormethylbenzyloxy)benzyliden)diaminomethylenhydrazon × TFA

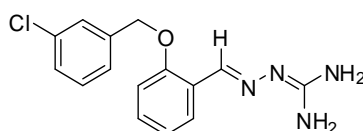


0,30 g (1,07 mmol) des Intermediats **20** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,32 g (67 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 51,0 % B; DC: R_f 0,92; MS ber.: 336,12, MS gef.: 337,0 (M+H)⁺.

MI-0391 (E)-2-(2-(3-Chlorbenzyloxy)benzyliden)diaminomethylenhydrazon × TFA

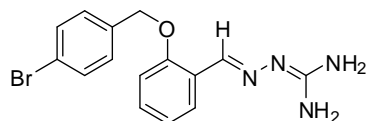


0,57 g (2,34 mmol) des Intermediats **21** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,33 g (34 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 48,1 % B; DC: R_f 0,91; MS ber.: 302,09, MS gef.: 303,0 (M+H)⁺.

MI-0392 (E)-2-(2-(4-Bromobenzyloxy)benzyliden)diaminomethylenhydrazon × TFA

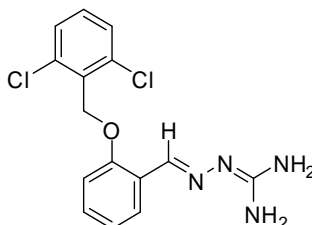


0,43 g (entsprechend maximal 1,19 mmol) des Intermediats **22** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,48 g (87,9 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 49,7 % B; DC: R_f 0,90; MS ber.: 347,21, MS gef.: 349,0 (M+H)⁺.

MI-0393 (E)-2-(2-(2,6-Dichlorobenzyloxy)benzyliden)diaminomethylenhydrazon × TFA

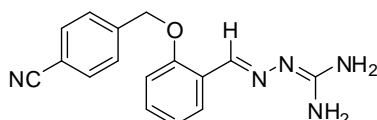


0,48 g (entsprechend maximal 1,34 mmol) des Intermediats **23** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,29 g (48,5 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 49,4 % B; DC: R_f 0,90; MS ber.: 336,05, MS gef.: 337,0 (M+H)⁺.

MI-0394 (E)-2-(2-(4-Cyanobenzyloxy)benzyliden)diaminomethylenhydrazon × TFA

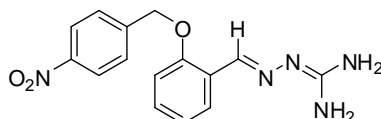


0,33 g (1,41 mmol) des Intermediats **14** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,21 g (38 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 42,6 % B; DC: R_f 0,89; MS ber.: 293,13, MS gef.: 294,1 (M+H)⁺.

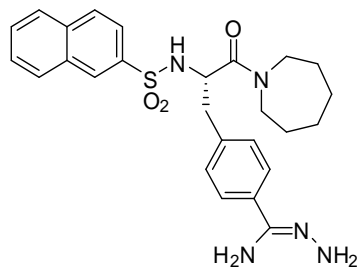
MI-0395 (E)-2-(2-(4-Nitrobenzyloxy)benzyliden)diaminomethylenhydrazon × TFA



0,36 g (1,40 mmol) des Intermediats **17** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 0,32 g (55 % der Theorie), weißer Feststoff.

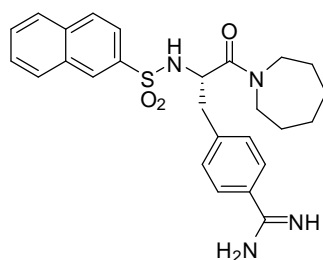
HPLC: 44,6 % B; DC: R_f 0,89; MS ber.: 313,12, MS gef.: 314,1 (M+H)⁺.

MI-0396 β -Nas-Phe(4-Amidrazono)-homoPip \times TFA

86 mg (0,15 mmol) des Intermediats **53** (Rohprodukt) wurden in 15 mL ACN gelöst, mit sechs Äquivalenten Hydrazinhydrat versetzt und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Ansatz mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Das Produkt wurde aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 15 mg (16 % der Theorie), weißer Feststoff.

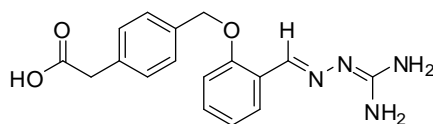
HPLC: 43,3 % B; DC: R_f 0,89; MS ber.: 493,21, MS gef.: 494,3 (M+H)⁺.

MI-0397 β -Nas-Phe(4-Amidino)-homoPip \times TFA

86 mg (0,15 mmol) des Intermediats **53** (Rohprodukt) wurden in 15 mL ACN gelöst, mit sechs Äquivalenten Ammoniak in EtOH (2 M) versetzt und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Ansatz mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Das Produkt wurde aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 25 mg (28 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 43,9 % B; DC: R_f 0,90; MS ber.: 478,2, MS gef.: 479,2 (M+H)⁺.

MI-0398 (E)-O-(2-(2-Diaminohydrazonomethyl)phenyl)-4-methoxyphenyl-essigsäure \times TFA

0,11 g (0,42 mmol) des Intermediats **16** wurden nach Vorschrift B umgesetzt.

Ausbeute: 40 mg (38 % der Theorie), weißer Feststoff.

HPLC: 40,0 % B; MS ber.: 326,12, MS gef.: 326,3 (M+H)⁺.

Referenzen

- Angliker, H., 1995. Synthesis of tight binding inhibitors and their action on the proprotein-processing enzyme furin. *J Med Chem* 38, 4014-4018.
- Antalis, T. M., Bugge, T. H., Wu, Q., 2011. Membrane-anchored serine proteases in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 99, 1-50.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T., 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195-201.
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Bolognesi, M., Spallarossa, A., Coletta, M., De Cristofaro, R., Menegatti, E., 2003. The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Curr Protein Pept Sci* 4, 231-251.
- Bajusz, S., Barabas, E., Tolnay, P., Szell, E., Bagdy, D., 1978. Inhibition of thrombin and trypsin by tripeptide aldehydes. *Int J Pept Protein Res* 12, 217-221.
- Banner, D., Ackermann, J., Gast, A., Gubernator, K., Hadváry, P., Hilpert, K., Labler, L., Müller, K., Schmid, G., Tschopp, T., van de Waterbeemd, H., Wirz, B., 1993. Serine Proteases: 3D Structures, Mechanisms of Action and Inhibitors. In: Testa, B., Kyburz, E., Fuhrer, W., Giger, R. (Eds.), *Perspectives in Medicinal Chemistry*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel, pp. 27-44.
- Baraldi, P. G., Preti, D., Tabrizi, M. A., Fruttarolo, F., Saponaro, G., Baraldi, S., Romagnoli, R., Moorman, A. R., Gessi, S., Varani, K., Borea, P. A., 2007. N(6)-[(hetero)aryl/(cyclo)alkyl-carbamoyl-methoxy-phenyl]-(2-chloro)-5'-N-ethylcarbox-amido-adenosines: the first example of adenosine-related structures with potent agonist activity at the human A(2B) adenosine receptor. *Bioorg Med Chem* 15, 2514-2527.
- Basak, A., 2005. Inhibitors of proprotein convertases. *J Mol Med* 83, 844-855.
- Basak, A., Chen, A., Scamuffa, N., Mohottalage, D., Basak, S., Khatib, A. M., 2010. Blockade of furin activity and furin-induced tumor cells malignant phenotypes by the chemically synthesized human furin prodomain. *Curr Med Chem* 17, 2214-2221.
- Basak, A., Cooper, S., Roberge, A. G., Banik, U. K., Chretien, M., Seidah, N. G., 1999. Inhibition of proprotein convertases-1, -7 and furin by diterpines of *Andrographis paniculata* and their succinoyl esters. *Biochem J* 338 (Pt 1), 107-113.
- Basak, A., Khatib, A. M., Mohottalage, D., Basak, S., Kolajova, M., Bag, S. S., 2009. A novel enediynyl peptide inhibitor of furin that blocks processing of proPDGF-A, B and proVEGF-C. *PLoS One* 4, e7700.
- Bassi, D. E., Fu, J., Lopez de Cicco, R., Klein-Szanto, A. J., 2005. Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression. *Mol Carcinog* 44, 151-161.

- Bassi, D. E., Lopez De Cicco, R., Mahloogi, H., Zucker, S., Thomas, G., Klein-Szanto, A. J., 2001. Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10326-10331.
- Baum, B., Mohamed, M., Zayed, M., Gerlach, C., Heine, A., Hangauer, D., Klebe, G., 2009. More than a simple lipophilic contact: a detailed thermodynamic analysis of nonbasic residues in the S1 pocket of thrombin. *J Mol Biol* 390, 56-69.
- Baum, T., Eckfeld, D. K., Metz, N., Dinisch, J. L., Rowles, G., Van Pelt, R., Shropshire, A. T., Fernandez, S. P., Gluckman, M. I., Bruce, W. F., 1969. 2,6-Dichlorobenzylidene amino guanidine acetate (Wy-8678). A new hypotensive agent. *Experientia* 25, 1066-1067.
- Becker, G. L., 2011. Entwicklung, Synthese und Charakterisierung neuartiger Furininhibitoren. Dissertation, Fachbereich Pharmazie, Philipps-Universität-Marburg.
- Becker, G. L., Harges, K., Steinmetzer, T., 2011. New substrate analogue furin inhibitors derived from 4-amidinobenzylamide. *Bioorg Med Chem Lett* 21, 4695-4697.
- Becker, G. L., Sielaff, F., Than, M. E., Lindberg, I., Routhier, S., Day, R., Lu, Y., Garten, W., Steinmetzer, T., 2010. Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics. *J Med Chem* 53, 1067-1075.
- Beliveau, F., Desilets, A., Leduc, R., 2009. Probing the substrate specificities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent peptides. *FEBS J* 276, 2213-2226.
- Bennett, B. D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D. B., Kahn, S., Louis, J. C., Citron, M., Vassar, R., 2000. A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta-secretase. *J Biol Chem* 275, 37712-37717.
- Bergner, A., Bauer, M., Brandstetter, H., Stürzebecher, J., Bode, W., 1995. The X-ray crystal structure of thrombin in complex with N alpha-2-naphthylsulfonyl-L-3-amidinophenylalanyl-4-methylpiperidide: the beneficial effect of filling out an empty cavity. *J Enzyme Inhib* 9, 101-110.
- Bernatowicz, M. S., Wu, Y., Matsueda, G. R., 1992. 1H-Pyrazole-1-carboxamidine hydrochloride an attractive reagent for guanylation of amines and its application to peptide synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* 57, 2497-2502.
- Berry, C. N., Lassalle, G., Lunven, C., Altenburger, J. M., Guilbert, F., Lale, A., Herault, J. P., Lecoffre, C., Pfersdorff, C., Herbert, J. M., O'Connor, S. E., 2002. SSR182289A, a novel, orally active thrombin inhibitor: in vitro profile and ex vivo anticoagulant activity. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 1189-1198.
- Bicknell, A. B., Lomthaisong, K., Woods, R. J., Hutchinson, E. G., Bennett, H. P., Gladwell, R. T., Lowry, P. J., 2001. Characterization of a serine protease that cleaves pro-gamma-melanotropin at the adrenal to stimulate growth. *Cell* 105, 903-912.
- Bignon, E., 2002. Triazole Derivatives and Pharmaceutical Compositions Comprising them. WIPO, Patent No. WO 02/34743 A1.

- Boltz, D. A., Aldridge, J. R., Jr., Webster, R. G., Govorkova, E. A., 2010. Drugs in development for influenza. *Drugs* 70, 1349-1362.
- Bork, P., Patthy, L., 1995. The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation. *Protein Sci* 4, 1421-1425.
- Böttcher-Friebertshäuser, E., Freuer, C., Sielaff, F., Schmidt, S., Eickmann, M., Uhlenendorff, J., Steinmetzer, T., Klenk, H. D., Garten, W., 2010. Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol* 84, 5605-5614.
- Böttcher, E., Freuer, C., Steinmetzer, T., Klenk, H. D., Garten, W., 2009. MDCK cells that express proteases TMPRSS2 and HAT provide a cell system to propagate influenza viruses in the absence of trypsin and to study cleavage of HA and its inhibition. *Vaccine* 27, 6324-6329.
- Böttcher, E., Matrosovich, T., Beyerle, M., Klenk, H. D., Garten, W., Matrosovich, M., 2006. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* 80, 9896-9898.
- Bravo, D. A., Gleason, J. B., Sanchez, R. I., Roth, R. A., Fuller, R. S., 1994. Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. Characterization and kinetic parameters using the purified, secreted soluble protease expressed by a recombinant baculovirus. *J Biol Chem* 269, 25830-25837.
- Brinkerhoff, C. J., Podsiadlo, P., Komiyama, T., Fuller, R. S., Blum, O., 2002. Protease inhibitors formed in situ from copper and tridentate chelates: a generalized approach towards metal-based pharmaceuticals. *Chembiochem* 3, 1141-1143.
- Buda, S. K., K.; Luchtenberg, M.; Schweiger, B.; Biere, B.; Duwe, S.; Fiebig, L.; Buchholz, U.; an der Heiden, M.; Haas, W., 2010. Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2009/2010. Robert Koch Institut, Berlin.
- Bugge, T. H., Antalis, T. M., Wu, Q., 2009. Type II transmembrane serine proteases. *J Biol Chem* 284, 23177-23181.
- Cameron, A., Appel, J., Houghten, R. A., Lindberg, I., 2000. Polyarginines are potent furin inhibitors. *J Biol Chem* 275, 36741-36749.
- Chaipan, C., Kobasa, D., Bertram, S., Glowacka, I., Steffen, I., Tsegaye, T. S., Takeda, M., Bugge, T. H., Kim, S., Park, Y., Marzi, A., Pohlmann, S., 2009. Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J Virol* 83, 3200-3211.
- Chiron, M. F., Fryling, C. M., FitzGerald, D. J., 1994. Cleavage of pseudomonas exotoxin and diphtheria toxin by a furin-like enzyme prepared from beef liver. *J Biol Chem* 269, 18167-18176.
- Chokki, M., Eguchi, H., Hamamura, I., Mitsunashi, H., Kamimura, T., 2005. Human airway trypsin-like protease induces amphiregulin release through a mechanism involving protease-activated receptor-2-mediated ERK activation and TNF alpha-converting enzyme activity in airway epithelial cells. *FEBS J* 272, 6387-6399.

Chokki, M., Yamamura, S., Eguchi, H., Masegi, T., Horiuchi, H., Tanabe, H., Kamimura, T., Yasuoka, S., 2004. Human airway trypsin-like protease increases mucin gene expression in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 470-478.

Clark, F. H., Cahoon, N. M., 1987. Ionization Constants by Curve Fitting: Determination of Partition and Distribution Coefficients of Acids and Bases and Their Ions. *J. Pharm. Sci.* 76, 611-620.

Coughlin, S. R., 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 3, 1800-1814.

Csizmadia, F., Tsantili-Kakoulidou, A., Panderi, I., Darvas, F., 1997. Prediction of Distribution Coefficient from Structure. 1. Estimation Method. *J. Pharm. Sci.* 86, 865-871.

D'Anjou, F., Routhier, S., Perreault, J. P., Latil, A., Bonnel, D., Fournier, I., Salzet, M., Day, R., 2011. Molecular Validation of PACE4 as a Target in Prostate Cancer. *Transl Oncol* 4, 157-172.

Dahlen, J. R., Jean, F., Thomas, G., Foster, D. C., Kisiel, W., 1998. Inhibition of soluble recombinant furin by human proteinase inhibitor 8. *J Biol Chem* 273, 1851-1854.

Dixon, M., 1953. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 55, 170-171.

Dixon, S. L., Jurs, P. C., 1993. Estimation of pKa for Organic Oxyacids Using Calculated Atomic Charges. *J. comp. chem.* 14, 1460-1467.

Dönnecke, D., Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Steinmetzer, P., Schuster, M., Stürzebecher, U., Nicklisch, S., Stürzebecher, J., Steinmetzer, T., 2007. From selective substrate analogue factor Xa inhibitors to dual inhibitors of thrombin and factor Xa. Part 3. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 3322-3329.

Dubois, C. M., Laprise, M. H., Blanchette, F., Gentry, L. E., Leduc, R., 1995. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270, 10618-10624.

Egbertson, M. S., Chang, C. T. C., Duggan, M. E., Gould, R. J., Halczenko, W., Hartman, G. D., Laswell, W. L., Lynch, J. J., Lynch, R. J., Manno, P. D., Naylor, A. M., Prugh, J. D., Ramjit, D. R., Sitko, G. R., Smith, R. S., Turchi, L. M., Zhang, G. X., 1994. Nonpeptide Fibrinogen Receptor Antagonists .2. Optimization of a Tyrosine Template as a Mimic for Arg-Gly-Asp. *Journal of Medicinal Chemistry* 37, 2537-2551.

Frerot, E., Coste, J., Pantaloni, A., Dufour, M.-N., Jouin, P., 1991. PyBop and PyBroP: Two reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid, Aib. *Tetrahedron* 47, 259-270.

Fuchs, S. M., Raines, R. T., 2006. Internalization of cationic peptides: the road less (or more?) traveled. *Cell Mol Life Sci* 63, 1819-1822.

Fugere, M., Day, R., 2005. Cutting back on pro-protein convertases: the latest approaches to pharmacological inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 26, 294-301.

- Gabriel, G., Klingel, K., Otte, A., Thiele, S., Hudjetz, B., Arman-Kalcek, G., Sauter, M., Schmidt, T., Rother, F., Baumgarte, S., Keiner, B., Hartmann, E., Bader, M., Brownlee, G. G., Fodor, E., Klenk, H. D., 2011. Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus. *Nat Commun* 2, 156.
- Gamblin, S. J., Skehel, J. J., 2010. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem* 285, 28403-28409.
- Garred, O., van Deurs, B., Sandvig, K., 1995. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem* 270, 10817-10821.
- Garten, W., Hallenberger, S., Ortmann, D., Schäfer, W., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H. D., 1994. Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie* 76, 217-225.
- Garten, W., Klenk, H. D., 1999. Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 7, 99-100.
- Garten, W., Klenk, H. D., 2008. Cleavage activation of the influenza virus hemagglutinin and its role in pathogenesis. In: Klenk, H. D., Matrosovich, M., Stech, J. (Eds.), *Avian Influenza*, vol. 27. Karger, Basel, pp. 156-167.
- Garten, W., Stieneke, A., Shaw, E., Wikström, P., Klenk, H. D., 1989. Inhibition of proteolytic activation of influenza virus hemagglutinin by specific peptidyl chloroalkyl ketones. *Virology* 172, 25-31.
- Gong, J., Fang, H., Li, M., Liu, Y., Yang, K., Liu, Y., Xu, W., 2009. Potential Targets and Their Relevant Inhibitors in Anti-influenza Fields. *Current Medicinal Chemistry* 16, 3716-3739.
- Grützmacher, H.-F., Mehdizadeh, A., Mülverstedt, A., 1994. A convenient Synthesis of Macrocylic[2.1.2.1]Paracyclophanes. *Chemische Berichte* 127, 1163-1166.
- Guex, N., Peitsch, M. C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Gustafsson, D., Bylund, R., Antonsson, T., Nilsson, I., Nystrom, J. E., Eriksson, U., Bredberg, U., Teger-Nilsson, A. C., 2004. A new oral anticoagulant: the 50-year challenge. *Nat Rev Drug Discov* 3, 649-659.
- Gustafsson, D., Elg, M., Lenfors, S., Borjesson, I., Teger-Nilsson, A. C., 1996. Effects of inogatran, a new low-molecular-weight thrombin inhibitor, in rat models of venous and arterial thrombosis, thrombolysis and bleeding time. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7, 69-79.
- Györgydeák, Z., Holzer, W., Mereiter, K., 1999. Guanyldrazones of (hetero)aryl methyl ketones: Structure and reaction with acetic anhydride. *Monatshefte Fur Chemie* 130, 899-913.

Hahner, S., Fassnacht, M., Hammer, F., Schammann, M., Weismann, D., Hansen, I. A., Allolio, B., 2005. Evidence against a role of human airway trypsin-like protease--the human analogue of the growth-promoting rat adrenal secretory protease-in adrenal tumourigenesis. *Eur J Endocrinol* 152, 143-153.

Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H. D., Garten, W., 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360, 358-361.

Hansen, I. A., Fassnacht, M., Hahner, S., Hammer, F., Schammann, M., Meyer, S. R., Bicknell, A. B., Allolio, B., 2004. The adrenal secretory serine protease AsP is a short secretory isoform of the transmembrane airway trypsin-like protease. *Endocrinology* 145, 1898-1905.

Hatta, M., Kawaoka, Y., 2002. The continued pandemic threat posed by avian influenza viruses in Hong Kong. *Trends Microbiol* 10, 340-344.

Hauel, N. H., Nar, H., Priepke, H., Ries, U., Stassen, J. M., Wienen, W., 2002. Structure-based design of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors. *J Med Chem* 45, 1757-1766.

Hellstern, P., Stürzebecher, U., Wuchold, B., Haubelt, H., Seyfert, U. T., Bauer, M., Vogt, A., Stürzebecher, J., 2007. Preservation of in vitro function of platelets stored in the presence of a synthetic dual inhibitor of factor Xa and thrombin. *J Thromb Haemost* 5, 2119-2126.

Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G. P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W., Than, M. E., 2003. The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol* 10, 520-526.

Herold, S., 2011. Pathogenese, Klinik und Therapie der Virusgrippe. *Pharmazie in unserer Zeit* 40, 115-119.

Holzer, W., Györgydeák, Z., 1992. On the Structure of Guanylylhydrazones Derived from Aromatic-Aldehydes. *Monatshefte Fur Chemie* 123, 1163-1173.

Holzgrabe, U., 2011. Wie sicher war die Oseltamivir-Versorgung in Zeiten der Grippe-Pandemie? *Pharm Unserer Zeit* 40, 151-154.

Hooper, J. D., Clements, J. A., Quigley, J. P., Antalis, T. M., 2001. Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J Biol Chem* 276, 857-860.

Informationen von Iris Lindberg, Institut für Anatomie und Neurobiologie, University of Maryland, Baltimore MD, USA.

Iwakiri, K., Ghazizadeh, M., Jin, E., Fujiwara, M., Takemura, T., Takezaki, S., Kawana, S., Yasuoka, S., Kawanami, O., 2004. Human airway trypsin-like protease induces PAR-2-mediated IL-8 release in psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* 122, 937-944.

Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Reason, A. J., Thomas, G., 1998. alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7293-7298.

- Jiao, G. S., Cregar, L., Wang, J., Millis, S. Z., Tang, C., O'Malley, S., Johnson, A. T., Sareth, S., Larson, J., Thomas, G., 2006. Synthetic small molecule furin inhibitors derived from 2,5-dideoxystreptamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19707-19712.
- Jones, S. D., Liebeschuetz, J. W., Morgan, P. J., Murray, C. W., Rimmer, A. D., Roscoe, J. M., Waszkowycz, B., Welsh, P. M., Wylie, W. A., Young, S. C., Martin, H., Mahler, J., Brady, L., Wilkinson, K., 2001. The design of phenylglycine containing benzamidine carboxamides as potent and selective inhibitors of factor Xa. *Bioorg Med Chem Lett* 11, 733-736.
- Judkins, B. D., Allen, D. G., Cook, T. A., Evans, B., Sardharwala, T. E., 1996. A versatile synthesis of amidines from nitriles via amidoximes. *Synthetic Communications* 26, 4351-4367.
- Kacprzak, M. M., Peinado, J. R., Than, M. E., Appel, J., Henrich, S., Lipkind, G., Houghten, R. A., Bode, W., Lindberg, I., 2004. Inhibition of furin by polyarginine-containing peptides: nanomolar inhibition by nona-D-arginine. *J Biol Chem* 279, 36788-36794.
- Kadono, S., Sakamoto, A., Kikuchi, Y., Oh-Eda, M., Yabuta, N., Koga, T., Hattori, K., Shiraishi, T., Haramura, M., Kodama, H., Ono, Y., Esaki, T., Sato, H., Watanabe, Y., Itoh, S., Ohta, M., Kozono, T., 2005. Structure of human factor VIIa/tissue factor in complex with a peptide-mimetic inhibitor: high selectivity against thrombin by introducing two charged groups in P2 and P4. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 61, 169-173.
- Kar, A., Argade, N., 2002. A Simple Key for Benzylic Mono- and gem-Dibromination of Primary Aromatic Amine Derivatives Using Molecular Bromine. *Synthesis*, 221-224.
- Kim, S., Hwang, S. Y., Kim, Y. K., Yun, M., Oh, Y. S., 1997. Rational design of selective Thrombin inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 7, 769-774.
- King, J. F., Lam, J. Y. L., Skonieczny, S., 1992. Mechanisms of Hydrolysis and Related Nucleophilic Displacement Reactions of Alkanesulfonyl Chlorides: pH Dependence and the Mechanism of Hydration of Sulfenes *J. Am. Chem. Soc.* 114, 1743-1749.
- Klebe, G., Schlitzer, M., 2011. M2-Inhibitoren und Neuraminidase-Inhibitoren. *Pharm Unserer Zeit* 40, 144-150.
- Klenk, H. D., 2011. Influenzaviren auf dem Weg vom Tier zum Menschen. *Pharm Unserer Zeit* 40, 104.
- Klenk, H. D., Garten, W., 1994. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 2, 39-43.
- Klenk, H. D., Garten, W., Matrosovich, M., 2011. Molecular mechanisms of interspecies transmission and pathogenicity of influenza viruses: Lessons from the 2009 pandemic. *Bioessays* 33, 180-188.
- Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M., Blödorn, J., 1975. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 68, 426-439.

- Komiyama, T., Coppola, J. M., Larsen, M. J., van Dort, M. E., Ross, B. D., Day, R., Rehemtulla, A., Fuller, R. S., 2009. Inhibition of Furin/Proprotein Convertase-catalyzed Surface and Intracellular Processing by Small Molecules. *J Biol Chem* 284, 15729-15738.
- Komiyama, T., Fuller, R. S., 2000. Engineered eglin c variants inhibit yeast and human proprotein processing proteases, Kex2 and furin. *Biochemistry* 39, 15156-15165.
- Kozyraki, R., Kristiansen, M., Silahdaroglu, A., Hansen, C., Jacobsen, C., Tommerup, N., Verroust, P. J., Moestrup, S. K., 1998. The human intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin: molecular characterization and chromosomal mapping of the gene to 10p within the autosomal recessive megaloblastic anemia (MGA1) region. *Blood* 91, 3593-3600.
- Künzel, S., Schweinitz, A., Reissmann, S., Stürzebecher, J., Steinmetzer, T., 2002. 4-amidinobenzylamine-based inhibitors of urokinase. *Bioorg Med Chem Lett* 12, 645-648.
- Kyrieleis, O. J., Huber, R., Ong, E., Oehler, R., Hunter, M., Madison, E. L., Jacob, U., 2007. Crystal structure of the catalytic domain of DESC1, a new member of the type II transmembrane serine proteinase family. *FEBS J* 274, 2148-2160.
- Laskowski, M., Jr., Kato, I., 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem* 49, 593-626.
- Levitin, F., Stern, O., Weiss, M., Gil-Henn, C., Ziv, R., Prokocimer, Z., Smorodinsky, N. I., Rubinstein, D. B., Wreschner, D. H., 2005. The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *J Biol Chem* 280, 33374-33386.
- Liebeschuetz, J. W., Jones, S. D., Morgan, P. J., Murray, C. W., Rimmer, A. D., Roscoe, J. M., Waszkowycz, B., Welsh, P. M., Wylie, W. A., Young, S. C., Martin, H., Mahler, J., Brady, L., Wilkinson, K., 2002. PRO_SELECT: combining structure-based drug design and array-based chemistry for rapid lead discovery. 2. The development of a series of highly potent and selective factor Xa inhibitors. *J Med Chem* 45, 1221-1232.
- Lila, C., Gloanec, P., Cadet, L., Herve, Y., Fournier, J., Leborgne, F., Verbeuren, T. J., De Nanteuil, G., 1998. Large scale preparation of protected 4-aminomethyl-benzamidine. Application to the synthesis of the thrombin inhibitor, melagatran. *Synthetic Communications* 28, 4419-4429.
- Lin, C. F., Yang, J. S., Chang, C. Y., Kuo, S. C., Lee, M. R., Huang, L. J., 2005. Synthesis and anticancer activity of benzyloxybenzaldehyde derivatives against HL-60 cells. *Bioorg Med Chem* 13, 1537-1544.
- List, K., Bugge, T. H., Szabo, R., 2006. Matriptase: potent proteolysis on the cell surface. *Mol Med* 12, 1-7.
- Loewenberg, M., Verhaar, A., van den Blink, B., ten Kate, F., van Deventer, S., Peppelenbosch, M., Hommes, D., 2005. Specific inhibition of c-Raf activity by semapimod induces clinical remission in severe Crohn's disease. *J Immunol* 175, 2293-2300.

- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., Israel, A., 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8108-8112.
- Lu, W., Zhang, W., Molloy, S. S., Thomas, G., Ryan, K., Chiang, Y., Anderson, S., Laskowski, M., Jr., 1993. Arg15-Lys17-Arg18 turkey ovomucoid third domain inhibits human furin. *J Biol Chem* 268, 14583-14585.
- Ludwig, S., Stitz, L., Planz, O., Van, H., Fitch, W. M., Scholtissek, C., 1995. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? *Virology* 212, 555-561.
- Lumma, W. C., Jr., Witherup, K. M., Tucker, T. J., Brady, S. F., Sisko, J. T., Naylor-Olsen, A. M., Lewis, S. D., Lucas, B. J., Vacca, J. P., 1998. Design of novel, potent, noncovalent inhibitors of thrombin with nonbasic P-1 substructures: rapid structure-activity studies by solid-phase synthesis. *J Med Chem* 41, 1011-1013.
- Markwardt, F., Wagner, G., Stürzebecher, J., Walsmann, P., 1980. N-alpha-arylsulfonyl-omega-(4-amidinophenyl)-alpha-aminoalkylcarboxylic acid amides - novel selective inhibitors of thrombin. *Thromb Res* 17, 425-431.
- Matrosovich, M., Matrosovich, T., Garten, W., Klenk, H. D., 2006. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virol J* 3, 63.
- Matrosovich, M., Stech, J., Klenk, H. D., 2009. Influenza receptors, polymerase and host range. *Rev Sci Tech* 28, 203-217.
- Matsushima, R., Takahashi, A., Nakaya, Y., Maezawa, H., Miki, M., Nakamura, Y., Ohgushi, F., Yasuoka, S., 2006. Human airway trypsin-like protease stimulates human bronchial fibroblast proliferation in a protease-activated receptor-2-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L385-395.
- Michaelis, M., Doerr, H. W., Cinatl, J., Jr., 2009. Of chickens and men: avian influenza in humans. *Curr Mol Med* 9, 131-151.
- Molloy, S. S., Anderson, E. D., Jean, F., Thomas, G., 1999. Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol* 9, 28-35.
- Morens, D. M., Taubenberger, J. K., Fauci, A. S., 2009. The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *N Engl J Med* 361, 225-229.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Müller, E. J., Caldelari, R., Posthaus, H., 2004. Role of subtilisin-like convertases in cadherin processing or the conundrum to stall cadherin function by convertase inhibitors in cancer therapy. *J Mol Histol* 35, 263-275.
- Okumura, Y., Takahashi, E., Yano, M., Ohuchi, M., Daidoji, T., Nakaya, T., Böttcher, E., Garten, W., Klenk, H. D., Kido, H., 2010. Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, Proteolytically activate membrane fusion activity of

the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication. *J Virol* 84, 5089-5096.

Osterhaus, A. D., Rimmelzwaan, G. F., Martina, B. E., Bestebroer, T. M., Fouchier, R. A., 2000. Influenza B virus in seals. *Science* 288, 1051-1053.

Parry, M. A., Zhang, X. C., Bode, I., 2000. Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues. *Trends Biochem Sci* 25, 53-59.

Petrera, N. S., Stafford, A. R., Leslie, B. A., Kretz, C. A., Fredenburgh, J. C., Weitz, J. I., 2009. Long range communication between exosites 1 and 2 modulates thrombin function. *J Biol Chem* 284, 25620-25629.

Pfleiderer, M., 2011. Grippe-Impfstoffe. *Pharm Unserer Zeit* 40, 126-134.

Plaimauer, B., Mohr, G., Wernhart, W., Himmelspach, M., Dorner, F., Schlokot, U., 2001. 'Shed' furin: mapping of the cleavage determinants and identification of its C-terminus. *Biochem J* 354, 689-695.

Podsiadlo, P., Komiyama, T., Fuller, R. S., Blum, O., 2004. Furin inhibition by compounds of copper and zinc. *J Biol Chem* 279, 36219-36227.

Powers, J. C., Asgian, J. L., Ekici, O. D., James, K. E., 2002. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* 102, 4639-4750.

Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Bateman, A., 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38, D227-233.

Reece, P. A., 2007. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses. *J Med Virol* 79, 1577-1586.

Rockwell, N. C., Krysan, D. J., Komiyama, T., Fuller, R. S., 2002. Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chem Rev* 102, 4525-4548.

Roebroek, A. J., Taylor, N. A., Louagie, E., Pauli, I., Smeijers, L., Snellinx, A., Lauwers, A., Van de Ven, W. J., Hartmann, D., Creemers, J. W., 2004. Limited redundancy of the proprotein convertase furin in mouse liver. *J Biol Chem* 279, 53442-53450.

Roebroek, A. J., Umans, L., Pauli, I. G., Robertson, E. J., van Leuven, F., Van de Ven, W. J., Constam, D. B., 1998. Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* 125, 4863-4876.

Roger, R., Neilson, D. G., 1961. The Chemistry of Imidates. *Chemical Reviews* 61, 179-211.

Ruggli, P., Gassenmeier, E., 1939. Über Di- und Tri-acetylbenzol und p-Phenylendi-glyoxal. *Helvetica Chimica Acta* 22, 496-511.

Saupe, S. M., Steinmetzer, T., 2011. A new strategy for the development of highly potent and selective plasmin inhibitors. *J Med Chem* in press.

Scamuffa, N., Siegfried, G., Bontemps, Y., Ma, L., Basak, A., Cherel, G., Calvo, F., Seidah, N. G., Khatib, A. M., 2008. Selective inhibition of proprotein convertases

represses the metastatic potential of human colorectal tumor cells. *J Clin Invest* 118, 352-363.

Schäfer, W., Stroh, A., Berghöfer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M. L., Kern, H. F., Klenk, H. D., Garten, W., 1995. Two independent targeting signals in the cytoplasmatic domain determine trans-golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J.* 14, 2424-2435.

Schechter, I., Berger, A., 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27, 157-162.

Schwarz, G., Alberts, H., Kricheldorf, H. R., 1981. Syntheses and Reactions of (Trimethylsiloxy)benzoyl Chlorides. *Liebigs Ann. Chem.* 1981, 1257-1270.

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M. C., 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31, 3381-3385.

Schweinitz, A., Steinmetzer, T., Banke, I. J., Arlt, M. J., Stürzebecher, A., Schuster, O., Geissler, A., Giersiefen, H., Zeslawska, E., Jacob, U., Krüger, A., Stürzebecher, J., 2004. Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J Biol Chem* 279, 33613-33622.

Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Stürzebecher, U., Schuster, O., Stürzebecher, J., Steinmetzer, T., 2006. New substrate analogue inhibitors of factor Xa containing 4-amidinobenzylamide as P1 residue: part 1. *Med Chem* 2, 349-361.

Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberte, J., Lazure, C., Chretien, M., Murphy, R. A., 1996. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* 314 (Pt 3), 951-960.

Seidah, N. G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R., Prat, A., 2008. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1111-1125.

Shearer, C. M., DeAngelis, N. J., 1979. Guanabenz degradation products and stability assay. *J Pharm Sci* 68, 1010-1012.

Shin, H., Kim, B. C., Hwang, S. Y., Lee, T. H., Chang, J. H., Choi, H. W., Lee, K. W., Choi, B. S., Kim, Y. K., Lee, J. H., Kim, W. S., Oh, Y. S., Lee, H. B., Kim, K. Y., 2006. Development of a scalable synthetic route towards a thrombin inhibitor, LB30057. *Organic Process Research & Development* 10, 881-886.

Shiraishi, T., Kadono, S., Haramura, M., Kodama, H., Ono, Y., Iikura, H., Esaki, T., Koga, T., Hattori, K., Watanabe, Y., Sakamoto, A., Yoshihashi, K., Kitazawa, T., Esaki, K., Ohta, M., Sato, H., Kozono, T., 2008. Factor VIIa inhibitors: target hopping in the serine protease family using X-ray structure determination. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 4533-4537.

Shiryaev, S. A., Remacle, A. G., Ratnikov, B. I., Nelson, N. A., Savinov, A. Y., Wei, G., Bottini, M., Rega, M. F., Parent, A., Desjardins, R., Fugere, M., Day, R., Sabet, M.,

Pellecchia, M., Liddington, R. C., Smith, J. W., Mustelin, T., Guiney, D. G., Lebl, M., Strongin, A. Y., 2007. Targeting host cell furin proprotein convertases as a therapeutic strategy against bacterial toxins and viral pathogens. *J Biol Chem* 282, 20847-20853.

Sisay, M. T., Steinmetzer, T., Stirnberg, M., Maurer, E., Hammami, M., Bajorath, J., Gütschow, M., 2010. Identification of the first low-molecular-weight inhibitors of matriptase-2. *J Med Chem* 53, 5523-5535.

Skehel, J. J., Wiley, D. C., 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69, 531-569.

Soll, R. M., Lu, T., Tomczuk, B., Illig, C. R., Fedde, C., Eisennagel, S., Bone, R., Murphy, L., Spurlino, J., Salemme, F. R., 2000. Amidinohydrazones as guanidine bioisosteres: application to a new class of potent, selective and orally bioavailable, non-amide-based small-molecule thrombin inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 10, 1-4.

Specht, S., Sarite, S. R., Hauber, I., Hauber, J., Goerbig, U. F., Meier, C., Bevec, D., Hoerauf, A., Kaiser, A., 2008. The guanylhydrazone CNI-1493: an inhibitor with dual activity against malaria-inhibition of host cell pro-inflammatory cytokine release and parasitic deoxyhypusine synthase. *Parasitol Res* 102, 1177-1184.

Steiner, D. F., 1998. The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol* 2, 31-39.

Steinmetzer, T., 2011. Strategien für die Entwicklung neuartiger Grippemittel. *Pharm Unserer Zeit* 40, 95.

Steinmetzer, T., Nowak, G., 2002. Oligo or Polyalkylene Glycol-coupled Inhibitors. WIPO, Patent No. WO 2002/059065.

Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Dönnecke, D., Uhland, K., Schuster, O., Steinmetzer, P., Müller, F., Friedrich, R., Than, M. E., Bode, W., Stürzebecher, J., 2006. Secondary amides of sulfonylated 3-amidinophenylalanine. New potent and selective inhibitors of matriptase. *J Med Chem* 49, 4116-4126.

Steinmetzer, T., Stürzebecher, J., 2004. Progress in the development of synthetic thrombin inhibitors as new orally active anticoagulants. *Curr Med Chem* 11, 2297-2321.

Stieneke-Gröber, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D., Garten, W., 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J* 11, 2407-2414.

Stüber, W., Koschinsky, R., Reers, M., Hoffmann, D., Czech, J., Dickneite, G., 1995. Preparation and Evaluation of PEG-Bound Thrombin Inhibitors Based on 4-Amidinophenylalanine. *Peptide Research* 8, 78-85.

Stürzebecher, A., 2005. Optimierung synthetischer Inhibitoren des Gerinnungsfaktors Xa vom 4-Amidinobenzylamid-Typ. Dissertation, Fachbereich Pharmazie, Philipps Universität Marburg.

Stürzebecher, A., Dönnecke, D., Schweinitz, A., Schuster, O., Steinmetzer, P., Stürzebecher, U., Kotthaus, J., Clement, B., Stürzebecher, J., Steinmetzer, T., 2007. Highly potent and selective substrate analogue factor Xa inhibitors containing D-homophenylalanine analogues as P3 residue: part 2. *ChemMedChem* 2, 1043-1053.

- Stürzebecher, J., Prasa, D., Hauptmann, J., Vieweg, H., Wikström, P., 1997. Synthesis and structure-activity relationships of potent thrombin inhibitors: piperazides of 3-amidinophenylalanine. *J Med Chem* 40, 3091-3099.
- Stürzebecher, J., Prasa, D., Wikström, P., Vieweg, H., 1995. Structure-activity relationships of inhibitors derived from 3-amidinophenylalanine. *J Enzyme Inhib* 9, 87-99.
- Stürzebecher, J., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Uhland, K., 2004. N-Sulphonylated Amino Acid Derivatives, Method for the Production and Use Thereof. WIPO, Patent No. WO/2004/101507A2.
- Stürzebecher, J., Vieweg, H., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stubbs, M. T., Renatus, M., Wikström, P., 1999. 3-Amidinophenylalanine-based inhibitors of urokinase. *Bioorg Med Chem Lett* 9, 3147-3152.
- Szabo, R., Bugge, T. H., 2008. Type II transmembrane serine proteases in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1297-1316.
- Szabo, R., Wu, Q., Dickson, R. B., Netzel-Arnett, S., Antalis, T. M., Bugge, T. H., 2003. Type II transmembrane serine proteases. *Thromb Haemost* 90, 185-193.
- Takahashi, M., Sano, T., Yamaoka, K., Kamimura, T., Umemoto, N., Nishitani, H., Yasuoka, S., 2001. Localization of human airway trypsin-like protease in the airway: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* 115, 181-187.
- Takahashi, S., Nakagawa, T., Banno, T., Watanabe, T., Murakami, K., Nakayama, K., 1995. Localization of furin to the trans-golgi network and recycling from the cell surface involves Ser and Tyr residues within the cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 270, 28397-28401.
- Taubenberger, J. K., Morens, D. M., 2010. Influenza: the once and future pandemic. *Public Health Rep* 125 Suppl 3, 16-26.
- Thomas, G., 2002. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 753-766.
- Tian, S., Huang, Q., Fang, Y., Wu, J., 2011. FurinDB: A Database of 20-Residue Furin Cleavage Site Motifs, Substrates and Their Associated Drugs. *Int J Mol Sci* 12, 1060-1065.
- Tucker, T. J., Brady, S. F., Lumma, W. C., Lewis, S. D., Gardell, S. J., Naylor-Olsen, A. M., Yan, Y., Sisko, J. T., Stauffer, K. J., Lucas, B. J., Lynch, J. J., Cook, J. J., Stranieri, M. T., Holahan, M. A., Lyle, E. A., Baskin, E. P., Chen, I. W., Dancheck, K. B., Krueger, J. A., Cooper, C. M., Vacca, J. P., 1998. Design and synthesis of a series of potent and orally bioavailable noncovalent thrombin inhibitors that utilize nonbasic groups in the P1 position. *J Med Chem* 41, 3210-3219.
- Tucker, T. J., Lumma, W. C., Mulichak, A. M., Chen, Z., Naylor-Olsen, A. M., Lewis, S. D., Lucas, R., Freidinger, R. M., Kuo, L. C., 1997. Design of highly potent noncovalent thrombin inhibitors that utilize a novel lipophilic binding pocket in the thrombin active site. *J Med Chem* 40, 830-832.

- Turk, B., 2006. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 5, 785-799.
- Uhland, K., 2006. Matriptase and its putative role in cancer. *Cell Mol Life Sci* 63, 2968-2978.
- Ulloa, L., 2005. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nat Rev Drug Discov* 4, 673-684.
- Ulrich, P., Cerami, A., 1984. Trypanocidal 1,3-arylene diketone bis(guanylhydrazones). Structure-activity relationships among substituted and heterocyclic analogues. *J Med Chem* 27, 35-40.
- WHO, 2011. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO vol. 2011.
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2011_08_02/en/ind.html; 3. September 2011.
- Wiley, M. R., Chirgadze, N. Y., Clawson, D. K., Craft, T. J., Giffordmoore, D. S., Jones, N. D., Olkowski, J. L., Schacht, A. L., Weir, L. C., Smith, G. F., 1995. Serine-protease selectivity of the thrombin inhibitor D-Phe-Pro-Agmatine and its homologs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 5, 2835-2840.
- Wysocka, M., Spichalska, B., Lesner, A., Jaros, M., Brzozowski, K., Legowska, A., Rolka, K., 2010. Substrate specificity and inhibitory study of human airway trypsin-like protease. *Bioorg Med Chem* 18, 5504-5509.
- Yamaoka, K., Masuda, K., Ogawa, H., Takagi, K., Umemoto, N., Yasuoka, S., 1998. Cloning and characterization of the cDNA for human airway trypsin-like protease. *J Biol Chem* 273, 11895-11901.
- Yasuoka, S., Ohnishi, T., Kawano, S., Tsuchihashi, S., Ogawara, M., Masuda, K., Yamaoka, K., Takahashi, M., Sano, T., 1997. Purification, characterization, and localization of a novel trypsin-like protease found in the human airway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16, 300-308.
- Zambon, M. C., 1999. Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother* 44 Suppl B, 3-9.
- Zambon, M. C., 2001. The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol* 11, 227-241.
- Zhang, Y., Kida, Y., Kuwano, K., Misumi, Y., Ikehara, Y., Arai, S., 2001. Role of furin in delivery of a CTL epitope of an anthrax toxin-fusion protein. *Microbiol Immunol* 45, 119-125.
- Zündorf, I., Dingermann, T., 2011. Die neuen (drohenden?) Grippe-Pandemien. *Pharm Unserer Zeit* 40, 120-125.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht worden:

Publikationen:

Sielaff F., Böttcher-Friebertshäuser E., Meyer D., Saupe S.M., Volk I.M., Garten W., Steinmetzer T.;

Development of substrate analogue inhibitors for the human airway trypsin-like protease HAT. BMCL, 21(16), 4860-4864.

Sielaff F., Than M.E., Bevec D., Lindberg I. Steinmetzer T.;

New furin inhibitors based on weakly basic amidinohydrazones. BMCL 21(2), 836-840.

Böttcher-Friebertshäuser E., Freuer C., Sielaff F., Schmidt S., Eickmann M., Uhlendorff J., Steinmetzer T., Klenk H. D., Garten W.;

Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. J Virol. 84(11), 5605-5614.

Becker G.L., Sielaff F., Than M.E., Lindberg I., Routhier S., Day R., Lu Y., Garten W., Steinmetzer T.;

Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics. J Med Chem 53(3), 1067-1075.

Steinmetzer T., Sielaff F., Garten W., Böttcher E., Freuer C., Matrosovich M., Matrosovich T.;

Verwendung von Hemmstoffen der HAT und TMPRSS2 als Medikamente.
Patent No. WO 2010/149459.

Steinmetzer T., Meyer D., Hammami M., Sielaff F., Böttcher-Friebertshäuser E., Garten W.;

Verwendung von Hemmstoffen der TMPRSS2 als Arzneimittel.
Patent No. DE 10 2011 108 346.8.

Posterbeiträge:

“Inhibitors of haemagglutinin cleaving proteases – Potential drugs for the treatment of influenza”;
Frontiers in Medicinal Chemistry, Münster; März 2010.

“Development of substrate-analogue plasmin inhibitors”;
10th German Peptide Symposium, Berlin; März 2011.

„Haemagglutinin cleaving proteases-potential targets for influenza treatment”;
DPHG Jahrestagung, Braunschweig; Oktober 2010.

“Cell-associated cleavage of influenza A virus hemagglutinin by human proteases TMPRSS2 and HAT and its inhibition by protease inhibitors”;
5th Orthomyxovirus Research Conference 2009, Freiburg; September 2009.

Verzeichnis der MI-Verbindungen

Aufgeführt sind die Fundstellen der Inhibitoren im Text. Der experimentelle Teil bleibt in diesem Register unberücksichtigt, da dort eine fortlaufende Anordnung der Verbindungen erfolgt.

MI-0001	101 , 102, 112 , 113, 115 , 116 , 117, 118 , 119 , 125	MI-0307	44 , 46, 59, 60, 65 , 66, 84, 122
MI-0003	101 , 112 , 115 , 117, 118 , 119	MI-0308	44 , 46
MI-0007	39 , 40, 46, 47, 48, 84, 121, 122, 123	MI-0309	43, 44 , 46
MI-0013	87	MI-0310	44 , 46, 65
MI-0017	105 , 113	MI-0311	97, 98, 108
MI-0019	86, 87	MI-0312	108 , 109
MI-0023	87	MI-0313	108
MI-0034	87	MI-0314	108
MI-0035	48, 50 , 66, 84	MI-0315	108
MI-0036	47 , 51, 65 , 66, 122	MI-0316	108
MI-0037	47 , 65	MI-0317	90, 101 , 112
MI-0038	47 , 65	MI-0318	57
MI-0039	47 , 65 , 122	MI-0319	56 , 57
MI-0040	56 , 65	MI-0320	101 , 112 , 115
MI-0041	47 , 65	MI-0321	101 , 112 , 115
MI-0047	82, 83	MI-0322	101 , 112 , 115
MI-0048	82, 83 , 86	MI-0323	100, 101 , 112 , 115
MI-0104	87, 88	MI-0324	87
MI-0109	82, 83	MI-0326	101 , 112
MI-0227	86, 87	MI-0327	101
MI-0300	42, 43 , 45	MI-0333	57
MI-0301	44 , 59, 60, 65 , 66	MI-0335	116, 117, 118
MI-0302	42, 43 , 45	MI-0339	50 , 51
MI-0303	44 , 46, 66	MI-0342	48, 49, 50 , 51, 65 , 122, 123
MI-0304	44 , 46	MI-0343	50 , 51
MI-0305	43 , 45	MI-0344	56 , 57
MI-0306	44 , 45	MI-0345	50 , 51
		MI-0346	50

MI-0347	56 , 57, 84	MI-0388	52, 54 , 55
MI-0348	52, 53	MI-0389	52, 54
MI-0349	52, 53	MI-0390	54 , 55, 63
MI-0350	52, 53	MI-0391	54 , 55
MI-0351	56 , 58	MI-0392	54
MI-0352	56 , 58	MI-0393	54 , 55
MI-0353	101 , 112	MI-0394	54 , 55
MI-0354	101 , 105, 106, 112	MI-0395	54 , 55
MI-0355	57 , 58	MI-0396	99, 110
MI-0356	44 , 46, 61, 62, 66, 122	MI-0397	99, 110
MI-0357	95, 106	MI-0398	54 , 55
MI-0358	106	MI-0400	85
MI-0359	53 , 63, 122	MI-0406	85
MI-0360	105	MI-0408	85
MI-0361	92, 101 , 112	MI-0409	88
MI-0366	105 , 113	MI-0416	85
MI-0367	105	MI-0425	88
MI-0369	108 , 109	MI-1020	87, 88
MI-0371	104, 105 , 113	MI-1060	103 , 112
MI-0373	107 , 124	MI-1061	103 , 112
MI-0374	95, 96, 107 , 124	MI-1062	103
MI-0375	104, 105	MI-1063	103
MI-0376	104, 105	MI-1064	103
MI-0377	105	MI-1065	103
MI-0378	104, 105 , 113	MI-1066	101 , 102
MI-0379	105	MI-1067	101
MI-0380	104, 105 , 113 , 114, 118, 119	MI-1068	103
MI-0381	93, 100, 104, 105 , 113 , 118, 119	MI-1069	103
MI-0382	104, 105	MI-1070	103
MI-0383	110	MI-1071	103
MI-0384	53 , 55	MI-1072	103
MI-0385	53 , 55	MI-1073	93, 101 , 102, 112
MI-0386	53	MI-1074	92, 93, 103 , 104, 112 , 118, 119 , 124
MI-0387	52, 53 , 55		

Danksagung

Prof. Dr. Torsten Steinmetzer danke ich herzlich für die interessante Themenstellung dieser Doktorarbeit und die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit. Ich danke ihm für die vielen fachlichen und persönlichen Gespräche und die fachliche Anleitung für die er stets Zeit gefunden hat. Auch möchte ich mich für die zahlreichen ausführlichen Korrekturen der Manuskripte bedanken.

Bei Prof. Dr. Wolfgang Garten bedanke ich mich für die Bereitschaft als Zweitgutachter zu fungieren und für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Testung der Inhibitoren in Zellkultur. Prof. Carsten Culmsee und Prof. Klaus Kuschinsky danke ich für ihre Bereitschaft in der Prüfungskommission mitzuwirken.

Ich danke Dr. Eva Böttcher-Friebertshäuser und Catharina Freuer für die tolle Zusammenarbeit bei der Erstellung von Publikationen und für die schnelle Testung von Inhibitoren in Zellkultur.

Meinen Bürokollegen Daniela Meyer, Kornelia Harges und Zouhir Hammamy danke ich für die gute Atmosphäre in B206, die gegenseitige Unterstützung und die vielen lustigen Geschichten und Anekdoten. Vielleicht gelingt über eine sorgfältige Postulatsformulierung doch noch die Konstruktion des Analysator-Synthetisator-Publikators T3000.

Unserer Auszubildenden Kathleen Hille danke ich für die Synthese von zahlreichen Verbindungen und für die zuverlässige Erledigung vieler Tätigkeiten, die den Laborbetrieb am Laufen gehalten haben. Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Instituts beim gemeinsamen Grillen, Feiern, Wandern, Paddeln, Klettern...

Ein großes Dankeschön an Heike Lang-Henkel und Nina Zitzer für die Aufnahme der zahlreichen Massenspektren und vor allem für ihre Geduld und Gelassenheit. Den Arbeitskreisen Diederich, Klebe und Schlitzer danke ich für die Überlassung von vielen Chemikalien und destillierten Lösungsmitteln, besonders zu Beginn meiner Arbeit. Ein herzlicher Dank gilt außerdem Herrn Mermann und Frau Brand für die zuverlässige Versorgung.

Den Praktikanten Julia Igler, Alexander Glatz und besonders André Wuttke danke ich für die geleistete Arbeit und der angehenden Diplom-Pharmazeutin Ines Volk danke ich für die Synthese der Piperazinserie und die schöne Zusammenarbeit.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Assistenten des ersten Semesters möchte ich mich für die zahlreichen lustigen Semesterdienste und für die Unterstützung bei organisatorischen Problemen bedanken. Meine Aufgaben übergebe ich mit einem guten Gefühl an den neuen Stern am Assistentenhimmel.

Ich möchte mich bei Daniela Meyer, Kornelia Harges, Dr. Tobias Craan, Dres. Nan-Si und Sascha Brass, Christian Hasewinkel, Florian Immekus, Michael Betz, Philipp Hoch, Christian Sohn, Rainer Müller und Steffi Dörr bedanken für die angenehme und lustige Zeit am Institut. Ein besonderer Dank geht an Anke, Kathi, Till, Evi, Philipp, Tobi, Nan-Si, Sascha, Mei-Lin, Dani, Joe, Hase und Diana für die vielen Aktivitäten in einem Leben außerhalb des Labors.

Dr. Ludwig Rößing, Dres. Nan-Si und Sascha Brass und Ingelore Sielaff danke ich sehr für das (wiederholte) gewissenhafte Korrekturlesen des Manuskripts.

Meinen Eltern gebührt großer Dank für ihre Unterstützung und Ermutigung ohne die das Studium und die Promotion nicht möglich gewesen wären und dafür, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Von ganzem Herzen danke ich Ilka für ihre Liebe, ihre unermüdliche Unterstützung und ihr Verständnis, besonders in der Schlussphase dieser Arbeit, ihren Rückhalt und ihr großes Vertrauen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

*„Synthese und Charakterisierung von Inhibitoren der hämagglutinin-
spaltenden Proteasen Furin und HAT“*

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 21. Oktober 2011

.....

Frank Sielaff

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Frank Sielaff
Geburtsdatum:	08.06.1982
Geburtsort:	Würselen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

AUSBILDUNG

Seit 01/2008	Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps Universität Marburg, Arbeitskreis Prof. Dr. Steinmetzer
01/2010 - 08/2011	Aufbaustudium "Intensivkurs Betriebswirtschaft und betriebliches Management (IWW)" am Institut für Wirtschaftswissenschaftliche Forschung und Weiterbildung der Fernuniversität Hagen
04/2009 - 09/2010	„Zusatzqualifikation Pharmarecht“ der Forschungsstelle für Pharmarecht, Philipps-Universität Marburg
12/2007	Approbation als Apotheker
05/2007 – 10/2007	Praktikum in der Struwwelpeter-Apotheke in Frankfurt
11/2006 – 04/2007	Praktikum bei Merck, Darmstadt in der Abteilung Medizinische Chemie
10/2002 – 10/2006	Studium der Pharmazie an der Philipps Universität Marburg
08/1992 – 06/2001	Städtisches Gymnasium Rheinbach; Abitur

ZIVILDIENTST

09/2001 – 06/2002	Diakonisches Werk in Bonn
-------------------	---------------------------